

Composition comprenant la polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b du VHC, vecteurs d'expression incluant les séquences nucléiques correspondantes et leur utilisation en thérapeutique

La présente invention concerne le domaine de la vaccination prophylactique et 5 thérapeutique dirigée contre le virus de l'hépatite C (VHC). Elle a notamment pour objet une nouvelle composition contenant une polyprotéine correspondant aux deux protéines colinéaires NS3 et NS4 (appelée ci-après polyprotéine NS3/NS4) et un polypeptide constitué de NS5b, les vecteurs, tels qu'adénovirus ou poxvirus, capables d'exprimer cette composition et leur utilisation en tant que vaccin.

10 L'hépatite C est la cause principale des hépatites acquises par transfusion. L'hépatite C peut également être transmise par d'autres voies percutanées, par exemple par injection de drogues par voie intraveineuse. Le risque de contamination des professionnels de la santé n'est par ailleurs pas négligeable. La transmission sexuelle a été décrite.

15 L'hépatite C se distingue des autres formes de maladies du foie associées à des virus, telles que les hépatites A, B ou D. Les infections par le virus de l'hépatite C (VHC ou HCV) sont majoritairement chroniques avec pour résultante des maladies du foie, telles que hépatite, cirrhose et carcinome dans un grand nombre de cas (5 à 20%) et représentent dans les pays développés 30% des transplantations hépatiques.

20 Bien que le risque de transmission du virus par transfusion ait diminué du fait de la mise en place de tests de criblage dans les années 1990, la fréquence de nouvelles infections par le VHC reste élevée. A titre d'exemple, une étude récente indique qu'il y aurait encore aujourd'hui 10 000 à 15 000 nouveaux cas d'infection par an en France (S. Deuffic et al., Hepatology 1999 ; 29 : 1596-1601). Actuellement, environ 170 millions de personnes à travers le monde sont infectées de manière chronique par le VHC (Hepatitis C: Global 25 prevalence (update) », 2000, Weekly Epidemiological Record, Vol 75(3)). Les populations à risque élevé sont principalement le personnel hospitalier et les utilisateurs de drogues intraveineuses, mais il existe des donneurs de sang asymptomatiques qui n'appartiennent pas à ces groupes à risque élevé et chez lesquels des anticorps anti-VHC circulants ont été retrouvés. Pour ces derniers, la voie de l'infection n'a encore pas été identifiée. Il existe donc

des infections à VHC (estimation entre 5 et 10%), dites infections sporadiques dont l'étiologie est inconnue et qui ne peuvent être contrôlées.

Le VHC a été le premier virus hépatotrope isolé au moyen des techniques de biologie moléculaire. Les séquences du génome viral ont été clonées avant que la particule virale n'ait 5 été visualisée.

Le VHC appartient à un nouveau genre de la famille des *Flaviviridae*, les hepacivirus. C'est un virus à ARN simple brin positif, de 9,5 kb, qui se réplique par une copie d'ARN complémentaire et dont le produit de traduction est un précurseur polyprotéique d'environ 3 000 acides aminés. L'extrémité 5' du génome du VHC correspond à une région 10 non traduite adjacente aux gènes qui codent pour les protéines structurales, la protéine core de la nucléocapside, les deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2, et une petite protéine appelée p7. La région non traduite 5' et le gène core sont relativement bien conservés dans les différents génotypes. Les protéines d'enveloppe E1 et E2 sont codées par des régions 15 plus variables d'un isolat à un autre. La protéine p7 est une protéine extrêmement hydrophobe qui constituerait un canal ionique. L'extrémité 3' du génome du VHC contient les gènes qui codent pour les protéines non structurales (NS2, NS3, NS4, NS5) et pour une 20 région 3' non codante possédant un domaine bien conservé (Major ME, Feinstone SM, Hepatology, juin 1997, 25(6) : 1527-1538).

A l'heure actuelle, la thérapie la plus efficace pour le traitement de l'hépatite C 25 associe l'interféron pégylé et la ribavirine (Manns MP et al., The Lancet, 22 septembre 2001, Vol. 358, 958-965). Alors que cette thérapie est particulièrement efficace dans le cas des patients infectés par des souches virales appartenant aux génotypes 2 et 3, elle n'a encore qu'un effet limité sur les génotypes 1a, 1b et 4 (Manns MP, *supra*). Moins de 50% des patients traités deviennent des «répondeurs au long terme ». Par ailleurs, cette thérapie est une intervention coûteuse (10 000 à 15 000 euro/patient/an) et est associée à des effets toxiques. En effet, 5 à 10% des patients sont obligés d'interrompre le traitement avant la fin.

Il est donc nécessaire de mettre au point une composition vaccinale ciblant tous les génotypes.

Plusieurs études montrent aujourd'hui que le contrôle d'une infection due au VHC,

soit naturellement («résolution spontanée»), soit après traitement («résolution thérapeutique») est associé à l'induction ou la potentialisation de réponses immunes à médiation cellulaire faisant intervenir les lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ (comme décrit par exemple dans LECHNER, F. et al., Eur. J. Immunol., 30 : 2479-2487 (2000) et dans 5 Thimme R. et al., 2001, J. Exp. Med., 194(10) : 1395-1406).

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou autrement appelé HLA chez l'homme) sont dites de classe I ou de classe II. Les molécules de classe I sont exprimées sur la quasi-totalité des cellules nucléées et sont capables de présenter des épitopes ou peptides aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8⁺. Les molécules de 10 classe II sont capables de présenter des épitopes aux cellules T CD4⁺, mais leur expression est restreinte aux cellules présentatrices d'antigène.

Les vaccins contre le virus de l'hépatite C actuellement envisagés sont basés sur l'utilisation de protéines recombinantes adjuvantes, de peptides, de vecteurs d'expression parmi lesquels on peut citer les vecteurs d'origine virale ou bactérienne ou d'ADN nu. Dans 15 ce cas, une ou plusieurs protéines virales ou un ou plusieurs gènes codant pour ces protéines virales sont utilisés.

Lorsque plusieurs protéines virales ou un ou plusieurs gènes codant pour ces protéines virales sont sélectionnés, ceux-ci sont souvent constitués soit par une partie ou l'ensemble des protéines structurales (Makimura et al., 1996, Vaccine, 14 : 28-34 ; 20 Fournillier A., et al, 1999, J. Virology, 73 : 7497-7504), soit par les protéines non structurales individuelles ou comprenant au moins deux protéines contiguës (Brinster et al., 2001, Hepatology, 34 : 1206-1217), soit par un mélange de protéines structurales et non structurales (Pancholi et al., 2003, J. Virology, 77 :382-390).

La demande de brevet WO99/38880 décrit l'utilisation de trois gènes codant 25 séparément pour les trois protéines NS3, NS4 et NS5 (a et b) dans une composition vaccinale comprenant trois vaccins ADN exprimant chacun séparément ces trois protéines. Les auteurs montrent chez la souris l'induction de lymphocytes T spécifiques des trois antigènes. Seul le vaccin exprimant NS5a et b a été testé *in vivo* dans un test de protection.

La demande de brevet WO01/30812 décrit quant à elle l'utilisation d'une protéine de

fusion constituée des protéines non structurales NS3, NS4 et NS5a, le cas échéant en association avec la protéine non structurale NS5b. Les auteurs ont indiqué que cette association permettait d'activer les cellules T spécifiques de VHC. Cette demande de brevet décrit simplement la capacité de formulations vaccinales (type ADN nu, adénovirus recombinant ou virus de la vaccine recombinant) exprimant la protéine de fusion NS3 NS4 NS5a ou la protéine NS5a à induire des réponses immunitaires spécifiques et médiées par des lymphocytes T spécifiques.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence, contre toute attente, que l'association particulière des protéines non structurales NS3, NS4 et NS5b, NS3 et NS4 étant exprimées de façon colinéaire, présentait un meilleur pouvoir immunogène et protecteur supérieur à celui obtenu avec un vaccin incluant, outre ces protéines non structurales, également la protéine NS5a et/ou d'autres protéines structurales du VHC telles que core, E1 ou E2, et avait un effet sur la capacité des cellules provenant de patients infectés par des souches virales à induire des réponses immunitaires spécifiques.

Ainsi, la présente invention a pour objet une composition peptidique comprenant une polyprotéine NS3/NS4 du virus de l'hépatite C, ainsi qu'un polypeptide NS5b du virus de l'hépatite C.

Elle a également pour objet, les vecteurs incluant les séquences nucléotidiques codant pour cette composition peptidique, tels que les adénovirus et les poxvirus, ainsi que les microorganismes ou cellules hôtes transformés par ces vecteurs.

Elle a enfin pour objet les anticorps dirigés contre la composition peptidique de l'invention, ainsi que l'utilisation de la composition peptidique, des vecteurs et des anticorps pour la préparation d'un médicament destiné à l'inhibition ou le contrôle d'une infection provoquée par le virus de l'hépatite C, et dans une composition vaccinale.

La présente invention propose donc une nouvelle composition peptidique constituée d'une polyprotéine NS3/NS4 et d'un polypeptide NS5b du VHC, laquelle composition a la capacité de stimuler une réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique du VHC, de sorte qu'elle est utile dans le domaine de la vaccination prophylactique et thérapeutique dirigée contre le virus de l'hépatite C.

La polyprotéine NS3/NS4 de la composition peptidique de l'invention est constituée de la protéine NS3 et de la protéine NS4a et b, sans interruption dans la séquence peptidique, comme dans la polyprotéine native. En effet, comme indiqué précédemment, le génome du VHC contient un seul cadre de lecture ouvert qui est transcrit en une polyprotéine.

5 Cette polyprotéine du VHC peut être clivée pour produire au moins dix parties distinctes, dans l'ordre NH₂-Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH.

La protéine NS3 est une protéine de 630 acides aminés qui apparaît approximativement de l'acide aminé 1027 à l'acide aminé 1657 de la polyprotéine. La protéine NS4, protéine de 314 acides aminés, quant à elle apparaît approximativement de 10 l'acide aminé 1658 à l'acide aminé 1972 (numérotation par rapport au VHC-1) (Choo et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., vol 88:2451-2455). La polyprotéine NS3/NS4 apparaît donc approximativement de l'acide aminé 1027 à l'acide aminé 1972.

S'agissant du polypeptide NS5b également contenu dans la composition de l'invention, il est constitué de 590 acides aminés et apparaît approximativement de l'acide 15 aminé 2421 à l'acide aminé 3011 de la polyprotéine (Choo et al., 1991, *supra*).

La protéine NS3 comprend deux domaines structuraux distincts, à savoir un domaine N-terminal doté d'une activité protéasique à sérine active intervenant dans la maturation de la polyprotéine virale et un domaine C-terminal comprenant une activité hélicase associée à une activité NTPasique qui joue un rôle dans la réPLICATION du génome viral.

20 Par « polyprotéine NS3/NS4 » et « polypeptide NS5b », on entend bien entendu les polyprotéines et polypeptides ayant les séquences en acides aminés natives, provenant de toute souche et isolat du VHC, ainsi que leurs analogues, mutéines et homologues.

Par « analogues » ou « mutéines » de la polyprotéine et du polypeptide, on entend les 25 dérivés biologiquement actifs des molécules de référence qui présentent l'activité souhaitée, à savoir la capacité à stimuler une réponse immunitaire à médiation cellulaire comme défini ci-dessus.

De façon générale, le terme « analogue » se réfère à des composés ayant une séquence et une structure polypeptidique native présentant une ou plusieurs additions, substitutions (généralement conservatrice en termes de nature) et/ou délétions d'acide aminé,

par rapport à la molécule native, dans la mesure où les modifications ne détruisent pas l'activité immunogène. Par le terme «mutéine», on entend les peptides présentant un ou plusieurs éléments imitant le peptide («peptoïdes»), tels que ceux décrits dans la demande de brevet PCT WO91/04282. De préférence, l'analogue ou la mutéine ont au moins la même 5 immunoactivité que la molécule native. Des procédés de préparation d'analogues et mutéines polypeptidiques sont connus de l'homme du métier et sont décrits ci-dessous.

Les analogues particulièrement préférés incluent les substitutions conservatrices en nature, c'est-à-dire les substitutions qui prennent place dans une famille d'acides aminés. Spécifiquement, les acides aminés sont généralement divisés en 4 familles, à savoir (1) les 10 acides aminés acides tels que l'aspartate et le glutamate, (2) les acides aminés basiques tels que la lysine, l'arginine et l'histidine, (3) les acides aminés non polaires tels que lalanine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine et le tryptophane et (4) les 15 acides aminés non chargés polaires tels que la glycine, l'asparagine, la glutamine, la cystéine, la sérine, la thréonine et la tyrosine. La phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine sont parfois classés en acides aminés aromatiques. Par exemple, on peut prédire de façon raisonnable qu'un remplacement isolé de leucine par de l'isoleucine ou de la valine, d'un aspartate par un glutamate, d'une thréonine par une sérine, ou un remplacement conservateur similaire d'un acide aminé par un autre acide aminé ayant un rapport structurel, n'aura pas d'effet majeur 20 sur l'activité biologique. L'homme du métier déterminera facilement les régions de la molécule peptidique d'intérêt qui peuvent tolérer un changement par référence à aux plots Hopp/Woods et Kyte-Doolite, biens connus dans la technique.

Par «homologie», on entend le pourcentage d'identité entre deux molécules peptidiques, telles que polyprotéines et polypeptides. Deux séquences d'acides aminés sont «sensiblement homologues» l'une par rapport à l'autre lorsque les séquences présentent au 25 moins 60%, de préférence au moins 75%, de préférence encore au moins 80-85%, de préférence encore au moins 90% et d'avantage préféré au moins 95-98% ou plus d'identité de séquence sur une longueur définie des molécules peptidiques.

De manière générale, le terme «identité» se réfère à une correspondance exacte acide aminé par acide aminé de deux séquences peptidiques. Le pourcentage d'identité peut

être déterminé par une comparaison directe de l'information de séquence entre deux molécules en alignant les séquences, en comptant le nombre exact de mésapparitions entre les deux séquences alignées, en divisant par la longueur de la séquence la plus courte et en multipliant le résultat par 100. Le pourcentage d'identité peut également être déterminé à 5 l'aide de programmes d'ordinateurs tels que ALIGN, Dayhoff, M.O. dans Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 1981, 5 Suppl., 3 : 482-489.

Les séquences d'acide nucléique et en acides aminés d'un certains nombre de souches et isolats du VHC, et en particulier de la protéine NS3, de la protéine NS4 et du polypeptide NS5b, ont déjà été déterminées.

10 Par exemple, l'isolat HCV-J1 est décrit dans Okamoto H. et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20 : 6410-6410. Les séquences codantes complètes de deux isolats indépendants du VHC, à savoir les isolats HCV-J et -BK, ont été décrits respectivement dans Kato et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87 : 9524-9528 et dans Takamizawa et al., 1991, J. Virol., 65 : 1105-1113. S'agissant de l'isolat HCV-1, il est décrit dans Choo et al., 1990, Brit. Med. Bull., 46 : 423-441 et dans Choo et al., 1991, *supra*. L'isolat HVC-H a été décrit dans Inchauspé G. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., 88 : 10292-10296. L'isolat HCV-G9 a été décrit dans Okamoto H., et al., 1994, J. Gen. Virol., 45 : 629-635. Les isolats HCV-J6 et -J8 ont été décrits respectivement dans Okamoto H., et al., 1991, J. Gen. Virol., 72 : 2697-2704 et Okamoto H., et al., 1992, Virology, 188 : 331-341. L'isolat 15 HVC-BEBE1 a été décrit dans Nako H., et al., 1996, J. Gen. Virol., 141 : 701-704 et l'isolat HCV-NZL1 a été décrit dans Sakamoto M., et al., 1994, J. Gen. Virol., 75 : 1761-1768. S'agissant de l'isolat HCV-Tr, il a été décrit dans Chayama K., et al., 1994, J. Gen. Virol., 75 : 3623-3628. Les isolats HCV-ED43 et -EUH1480 ont été décrits respectivement dans Chamberlain R.W., et al., 1997, J. Gen. Virol., 78 : 1341-1347 et Chamberlain R.W., et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., 236 : 44-49. L'isolat HCV-EUHK2 a été 20 décrit dans Adams A., et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., 234 : 393-396. Les isolats HCV-VN235, -VN405 et -VN004 ont été décrits dans Tokita H., et al., 1998, J. Gen. Virol., 79 : 1847. Enfin, s'agissant des isolats HCV-JK049 et -JK046, ils ont été 25 décrits dans Tokita H. et al., 1996, J. Gen. Virol., 77 : 293-301.

Les souches et isolats du VHC, tel qu'illustrés ci-dessus, peuvent présenter des génotypes différents, à savoir des génotypes 1a (isolats HCV-1, -J1 et -H), 1b (isolats HCV-J et BK), 1c (isolat HCV-G9), 2a (isolat HCV-J6), 2b (isolat HCV-J8), 2c (isolat HCV-BEBE1), 3a (isolat HCV-NZL1), 3b (isolat HCV-Tr), 4a (isolat HCV-ED43), 5a (isolat 5 HCV-EUH1480), 6a (isolat HCV-EUHK2), 7b (isolat HCV-VN235), 8b (isolat HCV-VN405), 9a (isolat HCV-VN004), 10a (isolat HCV-JK049) et 11a (isolat HCV-JK046).

Selon un mode de réalisation de l'invention, NS3 et/ou NS4 et/ou NS5b proviennent de virus de génotypes différents.

Selon un autre mode de réalisation, NS3 et/ou NS4 et/ou NS5b proviennent de virus 10 de même génotype, de préférence de génotype 1b.

La polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b contenus dans la composition peptidique de l'invention peuvent être soit d'origine native, soit d'origine recombinante.

La polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b d'origine native sont obtenus à partir des souches ou isolats du VHC, par le biais de l'utilisation d'armuces 15 oligonucléotidiques synthétiques qui vont servir à amplifier les séquences virales natives, soit à partir de sera de patients infectés par le ou les génotypes viraux ciblés, soit à partir d'ARN viral déjà purifié, provenant par exemple de sang ou de foie de patients, soit à partir d'ADN complémentaire libre ou cloné au préalable dans un vecteur d'expression, soit encore à partir de particules virales purifiées à partir de prélèvements biologiques ou de système de 20 propagation *in vitro*.

La polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b de l'invention d'origine recombinante peuvent également être obtenus par la technique du génie génétique qui comprend les étapes de :

- culture d'un microorganisme ou de cellules eucaryotes transformé(es) à l'aide d'une 25 séquence nucléotidique codant pour ladite polyprotéine NS3/NS4 ou pour ledit polypeptide NS5b et
- récupération du peptide produit par ledit microorganisme ou lesdites cellules eucaryotes.

Cette technique est bien connue de l'homme du métier. Pour plus de détails la concernant, on pourra se référer à l'ouvrage ci-après : Recombinant DNA Technology I,

Editors Ales Prokop, Raskesh K Bajpai; Annals of the New-York Academy of Sciences, Volume 646, 1991.

Les séquences nucléotidiques codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b peuvent être préparées par synthèse chimique couplée à une approche de 5 génie génétique ou par génie génétique seul, en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier et décrites par exemple dans Sambrook J. et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989.

Les séquences nucléotidiques codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b peuvent être insérées dans des vecteurs d'expression dans un système 10 d'expression adapté, afin d'obtenir la composition peptidique de l'invention.

Bien entendu, les séquences nucléotidiques peuvent être insérées dans un seul vecteur d'expression ou bien dans deux vecteurs d'expression différents. Dans ce dernier cas, la séquence codant pour la polyprotéine NS3/NS4 est insérée dans l'un des deux vecteurs et la séquence codant pour le polypeptide NS5b est insérée dans l'autre vecteur, ces deux 15 vecteurs pouvant être de nature identique ou différente.

Ainsi, un autre objet de l'invention consiste en les vecteurs d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide NS5b, ainsi que les moyens nécessaires à son expression.

20 On entend par moyen nécessaire à l'expression d'un peptide, le terme peptide étant utilisé pour toute molécule peptidique, telle que protéine, polyprotéine, polypeptide, etc., tout moyen qui permet d'obtenir le peptide, tel que notamment un promoteur, un terminateur de transcription, une origine de réplication et de préférence un marqueur de sélection.

Les moyens nécessaires à l'expression d'un peptide sont liés de façon opérationnelle 25 à la séquence d'acide nucléique codant pour le peptide d'intérêt. Par « liés de façon opérationnelle », on entend une juxtaposition desdits éléments nécessaires à l'expression et du gène codant pour le peptide d'intérêt, lesquels sont en une relation telle que cela leur permet de fonctionner de façon attendue. Par exemple, il peut exister des bases supplémentaires entre le promoteur et le gène d'intérêt tant que leur relation fonctionnelle est préservée.

Les moyens nécessaires à l'expression d'un peptide peuvent être des moyens homologues, c'est-à-dire inclus dans le génome du vecteur utilisé, ou bien être hétérologues. Dans ce dernier cas, lesdits moyens sont clonés avec le peptide d'intérêt à exprimer.

Des exemples de promoteurs hétérologues comprennent (i) les promoteurs viraux tels que le promoteur SV40 (Virus simien 40), le promoteur du gène de la thimidine-kinase du virus simplex de l'Herpès (TK-HSV-1), le LTR du virus du sarcome de Rous (RSV), le promoteur premier immédiat du cytomégolovirus (CMV) et le promoteur dernier majeur adénoviral (MLP), ainsi que (ii) tout promoteur cellulaire qui contrôle la transcription des gènes codant pour des peptides chez des eucaryotes supérieurs, tel que le promoteur du gène de phosphoglycéate-kinase (PGK) constitutif (Adra et al., 1987, Gene, 60 : 65-74), le promoteur des gènes spécifiques du foie alpha1-antitrypsine et FIX et le promoteur SM22 spécifique des cellules du muscle lisse (Moessler et al., 1996, Development, 122 : 2415-2425)

Selon un mode de réalisation de l'invention, les séquences nucléotidiques codant pour ladite polyprotéine NS3/NS4 et ledit polypeptide NS5b sont issus de génotypes différents.

Selon un autre mode de réalisation, les séquences nucléotidiques codant pour ladite polyprotéine et ledit polypeptide sont issus d'un virus de même génotype, de préférence le génotype 1b.

Là encore, on entend par «séquence nucléotidique », toutes les séquences codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b natifs, ainsi que pour leurs analogues, mutées et homologues, tels que définis précédemment.

Lesdites séquences contenues dans le vecteur d'expression peuvent être liées directement entre elles sous le contrôle d'un seul promoteur et/ou d'un seul élément régulateur de l'expression, ou bien elles peuvent être séparées en étant sous la dépendance chacune de promoteurs et/ou régulateurs de l'expression indépendants, identiques ou différents.

A titre de vecteur d'expression qui conviennent aux fins de l'invention, on peut citer par exemple les plasmides, les vecteurs viraux type adenovirus, poxvirus, virus de la vaccine, baculovirus, les vecteurs bactériens du type salmonelle, BCG.

Les adénovirus ont été détectés dans de nombreuses espèces animales, ne s'intègrent

pas et sont peu pathogènes. Ils sont capables d'infecter une variété de types cellulaires, les cellules en division et les cellules en repos. Ils possèdent un tropisme naturel pour les épithéliums bronchiques. De plus, ils ont été utilisés en tant que vaccins entériques vivants pendant de nombreuses années avec un excellent profil de sécurité. Enfin, on peut les faire 5 pousser facilement et les purifier en grande quantité. Ces caractéristiques ont fait que les adénovirus sont particulièrement appropriés pour une utilisation en tant que vecteurs d'expression et notamment en tant vecteurs de thérapie génique à des fins thérapeutiques et vaccinales.

Selon un mode de réalisation préféré, le vecteur de l'invention est un adénovirus.

10 Des exemples d'adénovirus à utiliser dans la présente invention peuvent être dérivés de toute source d'origine humaine ou animale, en particulier d'origine canine (par exemple CAV-1 ou CAV-2 ; référence Genbank CAV1GENOM et CAV77082, respectivement), d'origine avienne (référence Genbank AAVEDSDNA), d'origine bovine (telle que BAV3, Seshidhar Reddy et al., 1998, J. Virol., 72 : 1394-1402), d'origine ovine, féline, porcine, 15 d'origine simienne, ou bien d'un de leurs hybrides. Tout sérotype peut être utilisé. Toutefois, les adénovirus d'origine humaine sont préférés et en particulier l'adénovirus 5 (AdV).

De façon générale, les virus cités sont disponibles dans les collections ATCC et ont fait l'objet de nombreuses publications décrivant leur séquence, leur organisation et leur biologie, ce qui permet à l'homme du métier de les appliquer facilement. Par exemple, la 20 séquence de l'adénovirus type 5 est décrite dans la base de donnée Genbank (M73260 et M29978) et est incorporée ici par référence.

Le génome des adénovirus est constitué d'une molécule d'ADN linéaire double brin d'environ 36 kb portant plus d'environ 30 gènes nécessaires pour terminer le cycle viral. Les premiers gènes sont divisés en 4 régions dispersées dans le génome de l'adénovirus (E1 à 25 E4). Les régions E1, E2 et E4 sont essentielles pour la réplication virale. La région E3 est considérée comme une région non essentielle sur la base de l'observation que les virus mutants apparaissant naturellement ou les virus hybrides ayant perdu cette région E3 continuent à se répliquer comme les virus de type sauvage dans les cellules cultivées (Kelly et Lewis, 1973, J. Virol., 12 :643-652). Les derniers gènes (L1 à L5) codent en majorité pour

les protéines structurales constituant la capsidé virale. Ils chevauchent au moins en partie les premiers motifs de transcription et sont transcrits à partir d'un promoteur unique (MLP pour « Major Late Promoter »). De plus, le génome adénoviral porte aux deux extrémités des régions à action en *cis* essentielles pour la réplication d'ADN, respectivement les motifs de répétition inversés 5' et 3' (ITRs pour « Inverted Terminal Repeats ») et une séquence d'empaquetage.

Les adénovirus actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont dénués de la majorité de la région E1, ce qui rend les virus déficients au niveau de leur réplication pour éviter leur dissémination dans l'environnement et dans l'organisme hôte. En 10 outre, la plupart des adénovirus sont également dénués de la région E3 afin d'accroître leur capacité de clonage. La faisabilité du transfert de gène en utilisant ces vecteurs a été démontrée dans une variété de tissus *in vivo* (voir par exemple Yei et al., 1994, Hum. Gene Ther., 5 : 731-744 ; Dai et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 1401-1405 ; US6,099,831 ; et US6,013,638).

15 De préférence, les promoteurs utilisés dans les adénovirus comme vecteur d'expression, sont des promoteurs hétérologues tels que les promoteurs le CMV et le SV40.

De préférence encore, le promoteur CMV est le promoteur de la polyprotéine NS3/NS4 et le vecteur d'expression comprend comme séquence nucléotidique codant pour ladite polyprotéine la cassette d'expression CMV-NS3-NS4.

20 Par « cassette d'expression », on entend une séquence d'ADN contenant un promoteur et un cadre de lecture ouvert pour l'expression du peptide d'intérêt, à insérer dans un vecteur.

De préférence également, le promoteur SV40 est le promoteur du polypeptidé NS5b et le vecteur d'expression comprend comme séquence nucléotidique codant pour ledit 25 polypeptidé la cassette d'expression SV40-NS5b.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le génome de l'adénovirus est modifié de façon à remplacer la région E1 par la cassette d'expression CMV-NS3-NS4 et à remplacer la région E3 par la cassette d'expression SV40-NS5b.

Les méthodes de suppression et d'insertion de séquences d'ADN dans des vecteurs

d'expression sont largement connues de l'homme du métier et consistent notamment en des étapes de digestion enzymatique et ligature.

Un autre vecteur d'expression particulièrement approprié aux fins de l'invention est un poxvirus, lequel constitue un autre mode de réalisation de l'invention.

5 Les poxvirus constituent un groupe de virus complexe enveloppés, se distinguant principalement par leur morphologie inhabituelle, leur grand génome d'ADN et leur site cytoplasmique de réplication. Le génome de plusieurs éléments des *poxviridae*, comprenant la souche virale de la vaccine de Copenhagen (VV) (Goebel et al., 1990, Virol. 179 : 247-266 et 517-563) et la souche du virus de la vaccine modifiée d'Ankara (MVA) (Antoine et al., 10 1998, Virol., 244 : 635-396), a été cartographié et séquencé. La souche VV possède un génome d'ADN double brin d'environ 192 kb codant pour environ 200 protéines dont approximativement 100 sont impliquées dans l'assemblage du virus. La souche MVA est une souche du virus de la vaccine hautement atténueée, générée par plus de 500 passages en série de la souche d'Ankara du virus de la vaccine (CVA) sur des fibroblastes d'embryons de 15 poulet (Mayr et al., 1975, Infection, 3 : 6-16). Le virus MVA a été déposé devant la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) sous le numéro I721. La détermination de la séquence complète du génome du MVA et la comparaison avec celui du VV permet l'identification précise des altérations qui sont apparues dans le génome viral et la définition de sept délétions (I à VII) et de nombreuses mutations conduisant à des cadres de 20 lecture ouverts fragmentés (Antoine et al., 1998, Virology, 244 : 365-396).

D'autres exemples de poxvirus appropriés aux fins de l'invention comprennent le pox du canari, le pox de volaille, le pox de vache, l'entomopox, le pox de singe, le pox de porc et le pox de pingouin.

25 Le poxvirus se trouve sous deux formes morphologiquement distinctes, appelées virus mature intracellulaire (IMV) et virus extracellulaire enveloppé (EEV).

Le poxvirus utilisé comme vecteur d'expression de l'invention présente au moins l'une des caractéristiques suivantes, prises seules ou en association :

- (i) le poxvirus est un virus MVA,
- (ii) le poxvirus est sous forme morphologique IMV, et

(iii) le génome du poxvirus est modifié de façon à insérer la cassette d'expression NS3/NS4 et à insérer la cassette d'expression NS5b.

Lorsque le génome du poxvirus est modifié de façon à insérer les deux cassettes d'intérêt, les moyens nécessaires à leur expression sont homologues. Ainsi, dans le cas où on 5 utilise le virus MVA, l'expression de NS3/NS4 peut être par exemple sous le contrôle du promoteur ph5r de sorte que la cassette d'expression correspondante est ph5r-NS3-NS4, et l'expression de NS5b peut être par exemple sous le contrôle du promoteur p7.5 de sorte que la cassette d'expression correspondante est p7.5-NS5b, et vice et versa.

Selon un mode de réalisation particulier, lorsque le génome du poxivirus est modifié 10 de façon à insérer les deux cassettes d'intérêt, les deux dites cassettes d'expression sont orientées dans le même sens.

Selon un autre mode de réalisation particulier, elles sont orientées en sens opposé.

Là encore, les cassettes d'expression sont insérées dans le génome du poxvirus de façon connue par l'homme du métier, comme indiqué précédemment.

15 Les vecteurs de l'invention peuvent également comprendre des séquences nécessaires au ciblage des peptides vers des compartiments cellulaires particuliers. Un exemple de ciblage peut être le ciblage vers le réticulum endoplasmique obtenu en utilisant des séquences d'adressage du type de la séquence leader issue de la protéine E3 de l'adénovirus (Ciernik LF., et al., *The Journal of Immunology*, 1999, 162, 3915-3925).

20 Ils peuvent également comprendre des séquences nécessaires au ciblage vers les cellules dendritiques et au ciblage à la membrane des cellules.

L'invention a également pour objet les microorganismes et les cellules eucaryotes transformés par un vecteur d'expression de l'invention.

A titre d'exemples de microorganisme qui conviennent aux fins de l'invention, on peut 25 citer les levures, telles que celles des familles suivantes : *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Hanseluna*, *Yarowia*, *Schwanniomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* et *Kluveromyces lactis* étant préférées ; et les bactéries, telles que *E. coli* et celles des familles suivantes : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Strptococcus*, *Bacillus* et

Streptomyces.

A titre d'exemples de cellules eucaryotes, on peut citer les cellules provenant d'animaux tels que les mammifères, les reptiles, les insectes et équivalent. Les cellules eucaryotes préférées sont les cellules provenant du hamster chinois (cellules CHO), du singe 5 (cellules COS et Vero), du rein de hamster nain (cellules BHK), du rein de cochon (cellules PK 15) et du rein de lapin (cellules RK13), les lignées cellulaires humaines de l'ostéosacorme (cellules 143 B), les lignées cellulaires humaines HeLa et les lignées cellulaires humaines de l'hépatome (du type cellules Hep G2), ainsi que les lignées cellulaires d'insecte (par exemple de *Spodoptera frugiperda*).

10 Les cellules hôtes peuvent être fournies dans des cultures en suspension ou en flacon, dans des cultures tissulaires, des cultures d'organe et équivalent. Les cellules hôtes peuvent également être des animaux transgéniques.

15 L'invention concerne également des anticorps dirigés contre l'une des compositions peptidiques de l'invention telles que définies précédemment ou bien contre l'un des vecteurs d'expression de l'invention tels que définis précédemment.

Les anticorps selon l'invention sont soit des anticorps polyclonaux, soit monoclonaux.

20 Les anticorps polyclonaux susmentionnés peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec la composition peptidique de l'invention ou bien avec le vecteur de l'invention à titre «d'antigène d'intérêt», suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment un antigène viral d'intérêt.

25 Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec la composition peptidique de l'invention ou bien avec le vecteur de l'invention à titre «d'antigène d'intérêt», dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit antigène. Ces

lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myéloïdées "immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque 5 hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis de l'antigène d'intérêt pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie 10 d'affinité décrite ci-dessus.

Les compositions peptidiques, les vecteurs d'expression, les séquences nucléotidiques codant pour ladite polyprotéine NS3/NS4 et ledit polypeptide NS5b, ainsi que les anticorps de l'invention sont particulièrement efficaces pour l'inhibition, la prévention et le contrôle de l'infection des patients porteurs du virus du VHC, de sorte que leur utilisation pour la 15 préparation d'un médicament constitue un autre objet de l'invention.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, notamment vaccin, contenant à titre de substance active la composition peptidique de l'invention, ou bien un vecteur d'expression de l'invention, ou bien un vecteur d'expression 20 comprenant une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide NS5b, ou bien les séquences nucléotidiques codant pour ladite polyprotéine NS3/NS4 et ledit polypeptide NS5b, lesdites séquences nucléotidiques correspondant aux séquences contenues dans les vecteurs d'expression de l'invention, placées sous le contrôle d'éléments nécessaires à une expression constitutive et/ou inducible desdits peptides, ou bien l'un au 25 moins des anticorps de l'invention.

Par éléments nécessaires à une expression constitutive des peptides, on entend un promoteur ubiquitaire ou spécifique des cellules eucaryotes.

A titre d'éléments nécessaires à une expression inducible des peptides, on peut citer les éléments de régulation de l'opéron de *E. coli* pour la résistance à la tétracycline (Gossen

M. et al, Proc Natl Acad Sci USA, 89 : 5547-5551 (1992).

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition pharmaceutique contient également un véhicule pharmaceutiquement approprié. Bien entendu, l'homme du métier déterminera facilement la nature du véhicule pharmaceutiquement approprié et la 5 quantité de polypeptides à utiliser en fonction des constituants de la composition pharmaceutique.

La quantité et la nature du véhicule pharmaceutiquement approprié peuvent être facilement déterminées par l'homme du métier. Elles sont choisies selon la forme pharmaceutique et le mode d'administration souhaités.

10 Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont appropriées pour l'administration orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, topique, locale, intratrachéale, intranasale, transdermique, rectale, intraoculaire, intra-auriculaire, ledit principe actif pouvant être administré sous forme unitaire d'administration.

15 Les formes unitaires d'administration peuvent être par exemple des comprimés, des gélules, des granules, des poudres, des solutions ou suspensions orales injectables, des timbres transdermiques (« patch »), des formes d'administration sublinguale, buccale, intratrachéale, intraoculaire, intranasale, intra-auriculaire, par inhalation, des formes d'administration topique, transdermique, sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse, des formes d'administration rectale ou des implants. Pour l'administration topique, on peut 20 envisager des crèmes, gels, pommades, lotions ou collyres.

Ces formes galéniques sont préparées selon les méthodes usuelles des domaines considérés.

Lesdites formes unitaires sont dosées pour permettre une administration journalière de 0,001 à 10 mg de substance active par kg de poids corporel, selon la forme galénique.

25 Il peut y avoir des cas particuliers où des dosages plus élevés ou plus faibles sont appropriés ; de tels dosages ne sortent pas du cadre de l'invention. Selon la pratique habituelle, le dosage approprié à chaque patient est déterminé par le médecin selon le mode d'administration, le poids et la réponse du patient.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la présente invention concerne

également une méthode de traitement des pathologies associées au virus de l'hépatite C qui comprend l'administration, à un patient, d'une dose efficace d'un médicament de l'invention.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent de préférence à titre de substance active un des vecteurs de l'invention ou bien un vecteur d'expression comprenant 5 une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide NS5b, de sorte qu'elles sont utiles en vaccination prophylactique et thérapeutique.

La vaccination prophylactique et thérapeutique peut être mise en œuvre par injection d'un vaccin à base d'un ou plusieurs vecteurs d'expression de l'invention, dans la mesure où 10 le ou les vecteurs d'expression codent au final pour la polyprotéine NS3/NS4 et pour le polypeptide NS5b à titre de substance active, injection suivie de rappels ou non. Elle peut également être mise en œuvre en injectant deux types de vecteurs d'expression de l'invention différents, tout d'abord un adénovirus, puis un poxvirus, de façon simultanée ou différée dans le temps, et vice et versa.

15 Ces vecteurs peuvent être contenus dans un kit pharmaceutique.

Aussi, un autre objet de l'invention consiste en des kits pharmaceutiques, notamment vaccinaux, comprenant au moins un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et au moins un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide NS5b.

20 Un autre objet de l'invention consiste en des kits pharmaceutiques, notamment vaccinaux, comprenant au moins un vecteur d'expression de type adénovirus tel que défini précédemment et/ou au moins un vecteur d'expression de type poxvirus tel que défini précédemment.

La vaccination prophylactique et thérapeutique peut également être mise en œuvre par 25 injection d'un vaccin à base d'au moins un vecteur d'expression de l'invention, ou bien un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide NS5b, et d'au moins une composition pharmaceutique de l'invention constituée de la composition peptidique de l'invention ou des anticorps de l'invention. Elle

peut également être mise en œuvre par injection d'un vaccin à base d'au moins un vecteur d'expression de l'invention, ou bien un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide NS5b, et d'au moins une 5 séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et pour le polypeptide NS5b.

Aussi, un autre objet de l'invention consiste en des kits pharmaceutiques, notamment vaccinaux, comprenant au moins un vecteur d'expression de l'invention, ou bien un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour le 10 polypeptide NS5b, et au moins une composition pharmaceutique de l'invention ou au moins une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et pour le polypeptide NS5b.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants donnés uniquement à titre illustratif et non limitatif, ainsi qu'à l'aide des figures 1 à 7 annexées, sur 15 lesquelles :

- la figure 1A à 1K représente les cartes des différents plasmides utilisés pour l'obtention d'un adénovirus AdNS3NS4NS5b selon l'invention, sur lesquelles sont indiqués les sites des différentes enzymes de restriction et l'emplacement des fragments de séquence codant pour NS3/NS4 et pour NS5b,
- 20 - la figure 2A à 2H représente les cartes des différents plasmides utilisés pour l'obtention d'un poxvirus MAV NS3NS4NS5b selon l'invention, sur lesquelles sont indiqués les sites des différentes enzymes de restriction et l'emplacement des fragments de séquence codant pour NS3/NS4 et pour NS5b,
- la figure 3 donne la réponse cellulaire induite par l'adénovirus AdNS3NS4, 25 soit selon le test CTL (figure 3A) où on a utilisé l'épitope GLL pour stimuler les splénocytes en culture et pour charger les cibles du CTL et dont le résultat est exprimé en pourcentage de lyse spécifique en fonction du rapport effecteur/cible, soit selon le test ELISPOT (figure 3B), spécifique pour l'épitope GLL, où le résultat est donné en nombre de spots/ 10^6 cellules,

- la figure 4 donne la réponse cellulaire induite par l'adénovirus AdNS5b selon le test ELISPOT, spécifique des épitopes ALY et KLP,
- la figure 5 donne la réponse cellulaire induite par l'adénovirus AdCE1E2 selon le test CTL où on a utilisé l'épitope DLM pour stimuler les splénocytes en culture et pour charger les cibles du CTL et dont le résultat est exprimé en pourcentage de lyse spécifique en fonction du rapport effecteur/cible,
- la figure 6 donne le titre de virus recombinant de la vaccine, résultant du test d'épreuve, en pfu/ml/mg ovaire, pour les 4 groupes de 8 souris immunisées par les différentes combinaisons d'adénovirus : AdNS3NS4 + AdNS5b (1^{er} groupe), les adénovirus AdNS3NS4 + AdNS5b + AdNS5a (2^{ème} groupe), les adénovirus AdNS3NS4 + AdNS5b + AdCE1E2 (3^{ème} groupe) et l'adénovirus Ad β Gal (4^{ème} groupe) et
- la figure 7 donne le titre de virus recombinant de la vaccine, résultant du test d'épreuve, en pfu/ml/mg ovaire, pour les 3 groupes de 8 souris immunisées par les différentes combinaisons d'adénovirus suivantes : AdNS3NS4NS5b (1^{er} groupe), AdNS3NS4 + AdNS5b (2^{ème} groupe) et Ad β Gal (3^{ème} groupe).

Exemple 1 : Préparation d'un adénovirus permettant l'expression des protéines NS3/NS4 et NS5b selon l'invention

20 **1 Adénovirus**

Les adénovirus recombinants sont générés par transfection (CaPO₃) de la lignée de complémentation 293 (Graham, Smiley, et al. 1977) après linéarisation des génomes par PacI. Les virus recombinants se propagent et sont amplifiés sur cette même lignée, et leur purification est réalisée à partir des cellules infectées. Les cellules sont récupérées par centrifugation (1500 tpm (tours par min), 10 min) et lysées par 3 cycles de congélation/décongélation. Le lysat cellulaire est clarifié par deux centrifugations (2000 tpm, 10 min; 8000 tpm, 15 min), puis purifié par deux ultracentrifugations successives. La première est réalisée sur un gradient de Chlorure de Césium (densités 1,4 et 1,25) à 30000 tpm pendant 1 heure. La seconde est réalisée sur un coussin de Chlorure de Césium (densité

1,34) à 35000 tpm pendant 18 heures. Les phases contenant les virions sont prélevées et diluées de moitié dans un tampon saccharose 60%. Les suspensions virales sont alors dialysées contre du tampon de formulation (pour 10 litres: 3423g de saccharose; 12,11g de Tris; 2,033g de MgCl₂; 87,7g de NaCl), puis aliquotées. Leur titrage est réalisé par 5 immunofluorescence indirecte sur cellules 293 infectées par différentes dilutions virales et marquées par un anticorps spécifique de la DNA-Binding Protein adénovirale (α72K B6-8) (Reich, Sarnow, et al. 1983).

2 Préparation de l'adénovirus AdNS3NS4

Cet adénovirus permet l'expression du gène codant pour la polyprotéine NS3/NS4 10 (SEQ ID N°1 et 2) sous le contrôle du promoteur CMV.

2.1 Amplification par PCR de la séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4

Pour ce faire, on a utilisé les oligonucléotides suivants :

oIV166: 5'-GGG GGG GCT ATG GCG CCT ATC ACG GCC TA-3' (SEQ ID N°9)

15 oIV171: 5'-GGG GGG ACG CGT TTA GCA TGG CGT GGA GCA GT-3' (SEQ ID N°10)

ainsi que les réactifs suivants :

Taq DNA Polymérase, tampon PCR, MgCl₂ 1,5mM et dNTP 10mM (Invitrogen).

Les conditions de PCR ont été les suivantes :

20 5 min à 94°C, puis

30 cycles de la série : 45 s à 94°C, 45 s à 62°C et 1 min à 72°C, puis

10 min à 72°C

2.2 Insertion du fragment de PCR NS3/NS4 dans le plasmide de transfert pTG13387

25 On a effectué les étapes suivantes :

- Digestion enzymatique du plasmide pTG13387 (figure 1A, Transgène) par *NheI/MluI* (*NheI*, Invitrogen dans React 4 Buffer et *MluI*, Invitrogen dans React 3 Buffer)

- Digestion enzymatique du fragment NS3/NS4 par *NheI/MluI*

- Ligature(T4 DNA Ligase (Invitrogen) dans Reaction Buffer (Invitrogen)),

- Transformation bactérienne (souche 5K, Transgène)
- Sélection des clones bactériens sur milieu LB (Difco) + ampicilline (100 µg/ml, Duchefa)
- Maxi-préparation plasmidique (Qiagen, selon le protocole du fournisseur) d'un clone positif après analyse de restriction

5 - Analyse de restriction : digestion par *Sma*I (Invitrogen dans React 4 Buffer) et obtention de fragments de : 5450, 2164, 909, 214 et 180 pb

- Obtention du plasmide pIV315 déléte de sa région E1 et contenant la séquence NS3/NS4 sous le contrôle du promoteur CMV (figure 1B).

2.3 Recombinaison homologue avec le génome adénoviral complet déléte de sa
10 région E3 contenu dans le plasmide pTG6624

On a effectué les étapes suivantes :

- Digestion enzymatique du plasmide obtenu ci-dessus pIV315 par *Pac*I/*Pvu*I (*Pac*I dans tampon NEB1, Biolabs et *Pvu*I dans React 7 Buffer, Invitrogen); isolement sur gel d'agarose du fragment contenant la cassette pCMV-NS3-NS4

15 - Digestion enzymatique du plasmide pTG6624 (figure 1C) par *Cla*I (dans React 1 Buffer, Invitrogen)

- Transformation bactérienne (souche BJ, Transgène) pour effectuer la recombinaison homologue entre les deux fragments plasmidiques

- Sélection des clones bactériens sur milieu LB + ampicilline (100 µg/ml)

20 - Maxi-préparation plasmidique (Qiagen) d'un clone positif après analyse de restriction

- Analyse de restriction : digestion par *Sma*I et obtention de fragments de : 2263, 621, 3814, 214, 2164, 909, 180, 2463, 6480, 1398, 4456, 1455, 3540, 3386, 230 et 3685 pb

- Obtention du génome adénoviral complet Adénovirus AdNS3NS4, déléte de ses régions E3 et E1, cette dernière ayant été remplacée par la cassette d'expression pCMV-NS3-NS4

25 (pIV317, figure 1D).

3 Préparation de l'adénovirus AdNS3NS4NS5b

Cet adénovirus permet l'expression du gène codant pour la polyprotéine NS3/NS4 sous le contrôle du promoteur CMV et l'expression du gène codant pour le polypeptide NS5b sous le contrôle du promoteur SV40

3.1 Construction du plasmide de transfert permettant le clonage dans la région E3 de l'adénovirus d'une séquence codante sous le contrôle du promoteur CMV

On a mis en œuvre les étapes suivantes :

- Digestion enzymatique du plasmide pTG4664 (figure 1E, Transgène) par *Bg*III (dans React 3 Buffer, Invitrogen)
- Digestion enzymatique du plasmide pTG13074 (figure 1F, Transgène) par *Bam*HI/*Bg*III (dans React 3 Buffer, Invitrogen)
- Ligature (T4 DNA ligase), transformation bactérienne (souche 5K)
- Sélection des clones bactériens sur milieu LB + ampicilline (100 µg/ml)
- Maxi-préparation plasmidique (Qiagen) d'un clone positif après analyse de restriction
- Analyse de restriction : digestion par *Sma*I et obtention de fragments de : 4940, 1305 et 230 pb
- Obtention du plasmide pIV267 (figure 1G)
- Digestion du plasmide ainsi obtenu pIV267 par *Cla*I/*Mun*I (dans React 1 Buffer, Invitrogen)
- Traitement par la DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (dans React 2 Buffer, Invitrogen)
- Ligature (T4 DNA Ligase)
- Transformation bactérienne (souche 5K)
- Sélection des clones bactériens sur milieu LB + ampicilline (100 µg/ml)
- Maxi-préparation plasmidique (Qiagen)
- Analyse de restriction : digestion par *Sma*I et obtention de fragments de : 4692, 1305 et 230 pb
- Obtention du plasmide pIV270, plasmide de transfert permettant le clonage dans la région E3 de l'adénovirus d'une séquence codante sous le contrôle du promoteur CMV (figure 1H).

3.2 Remplacement du promoteur CMV par le promoteur SV40 dans pIV270

On a effectué les étapes suivantes :

- Amplification par PCR du fragment nucléotidique correspondant au promoteur SV40, à partir du plasmide commercial pcDNAHygro (Clonetech) grâce aux oligonucléotides suivants:

- oIV232: 5'-GGG GGG AGA TCT CCA GCA GGC AGA AGT ATG-3' (SEQ ID N°11)
- oIV233: 5'-GGG GGG GTC GAC CGA AAA TGG ATA TAC AAG CTC-3' (SEQ ID N°12)

5 et selon le mode opératoire décrit dans le point 2.1 ci-dessus, à ceci près qu'on a utilisé une température de 58°C à la place de 62°C

- Digestion enzymatique de pIV270 par *Bgl*II/*Sal*I (dans React 10 Buffer, Invitrogen)
- Digestion enzymatique du fragment de PCR par *Bgl*II/*Sal*I
- Ligature (T4 DNA ligase), transformation bactérienne (souche 5K)

10 - Sélection des clones bactériens sur milieu LB + ampicilline (100 µg/ml)

- Maxi-préparation plasmidique (Qiagen) d'un clone positif après analyse de restriction
- Analyse de restriction : digestion par *Smal* et obtention de fragments de : 4692, 719, 80 et 230 pb

15 - Obtention du plasmide pIV330, plasmide de transfert permettant le clonage dans la région E3 de l'adénovirus d'une séquence codante sous le contrôle du promoteur SV40 (figure 1I).

3.3 Insertion du fragment de PCR NS5b dans le plasmide de transfert pIV330

On a effectué les étapes suivantes :

- Amplification par PCR de la séquence nucléotidique codant pour la protéine NS5b (SEQ ID N°3 et 4) grâce aux oligonucléotides suivants:

20 - oIV212: 5'-GGG GGG TCT AGA ATG TCA ATG TCC TAC ACA TGG AC-3' (SEQ ID N°13)

- oIV218: 5'-GGG GGG TCT AGA TTA CCG GTT GGG GAG CAG GT-3' (SEQ ID N°14)

et selon le mode opératoire décrit dans le point 2.1 ci-dessus, à ceci près qu'on a utilisé une température de 60°C à la place de 62°C

25 - Digestion enzymatique du plasmide pIV330 obtenu ci-dessus par *Xba*I (dans React 2 Buffer, Invitrogen)

- Digestion enzymatique du fragment de PCR par *Xba*I
- Ligature (T4 DNA Ligase), transformation bactérienne (souche 5K)

- Sélection des clones bactériens sur milieu LB + ampicilline (100 µg/ml)
- Maxi-préparation plasmidique (Qiagen) d'un clone positif après analyse de restriction
- Analyse de restriction : digestion par *Sma*I et obtention de fragments de : 4692, 1505, 760, 719 et 230 pb

5 - Obtention du plasmide pIV336, plasmide de transfert dans la délétion E3 contenant la séquence NS5b sous le contrôle du promoteur SV40 (figure 1J)

3.4 Recombinaison homologue avec le génome adénoviral recombinant pIV317 pour obtenir l'adénovirus du titre

On a mis en œuvre les étapes suivantes :

- 10 - Digestion du plasmide pIV317 obtenu dans le point 2.3 ci-dessus par *Srf*I (dans Universal Buffer, Stratagene)
- Digestion du plasmide pIV336 obtenu dans le point 3.3 par *Nhe*I/*Sac*II (dans Buffer T, Amersham Pharmacia Biotech) et isolement sur gel d'agarose du fragment contenant la cassette pSV40-NS5b
- 15 - Transformation bactérienne (souche BJ) pour effectuer la recombinaison homologue entre les deux fragments plasmidiques
- Sélection des clones bactériens sur milieu LB + ampicilline (100 µg/ml)
- Maxi-préparation plasmidique (Qiagen) d'un clone positif après analyse de restriction
- Analyse de restriction : digestion par *Sma*I et obtention de fragments de : 6480, 4456,

20 3814, 3540, 3386, 2739, 2463, 2263, 2164, 1455, 1398, 1105, 909, 760, 719, 621, 230, 214 et 180 pb

- Obtention du génome adénoviral complet souhaité, délété de la région E1, celle-ci ayant été remplacée par la cassette d'expression pCMV-NS3-NS4, et délété de la région E3, celle-ci ayant été remplacée par la cassette d'expression pSV40-NS5B (plasmide pIV342, figure 1K).

4 Confirmation de l'expression des antigènes insérés dans les différents adénovirus

L'expression des antigènes du VHC codés par les adénovirus AdNS3NS4, AdNS5b et AdNS3NS4NS5b a été vérifiée par Western blot après infection de cellules Huh7.

Comme attendu, tous les antigènes ont été exprimés.

Exemple 2 : Préparation d'un poxvirus permettant l'expression des protéines NS3/NS4 et NS5b selon l'invention

5 **1 Poxvirus MVA**

La souche Modified Virus Ankara MVATG N33 a été fourni par TRANSGENE S.A. (Strasbourg, France).

2 Préparation du plasmide de transfert permettant l'expression du gène NS3/NS4 sous le contrôle du promoteur ph5r

10 2.1 Construction du vecteur pIV250 contenant les bras de recombinaison BRG2 et BRD2 du MVA, ainsi que le gène de sélection GPT sous le contrôle du promoteur ph5r (MVA), suivi d'un deuxième promoteur ph5r pour permettre l'expression du gène d'intérêt

Dans ce point, on souhaite l'insertion du fragment ph5r-GPT-BRG3-ph5r (provenant du plasmide pTG9997, Transgène) dans le plasmide pTG6018 (Transgène) contenant les 15 bras de recombinaison BRG2 et BRD2.

Pour ce faire, on a effectué les étapes suivantes :

- Digestion enzymatique par *BamHI/SacI* (dans React 2 Buffer, Invitrogen) du vecteur pTG6018 (figure 2A)
- Digestion enzymatique par *BamHI*, puis digestion partielle par *SacI* du plasmide pTG9997 (figure 2B)
- Purification selon le protocole de QIAGEN du fragment de restriction de 1047 pb qui contient la séquence codant pour ph5r-GPT-BRG3-ph5r
- Ligature (T4 DNA Ligase), transformation bactérienne (souche TG1, Statagene)
- Sélection des clones bactériens sur ampicilline (100 µg/ml)
- Maxi-préparation plasmidique (Qiagen) d'un clone positif après analyse de restriction (*EcoRV + HindIII* (dans React 2 Buffer, Invitrogen) : fragments de 246, 439, 476, 826 et 25 2789 pb ; *SacI* : fragments de 915 et 3861 pb)
- Obtention du plasmide visé (pIV250, figure 2C).

2.2 Amplification par PCR de la séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine

NS3/NS4

On a utilisé les oligonucléotides suivants :

oIV225: 5'- GGG GGG CTG CAG ATG GCG CCT ATC ACG GCC TA -3' (SEQ ID N°15)

5 oIV226: 5'- GGG GGG TCT AGA TTA GCA TGG CGT GGA GCA GT -3' (SEQ ID N°16)

et selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1, point 2.1 ci-dessus, à ceci près qu'on a utilisé une température de 52°C à la place de 62°C

2.3 Insertion du fragment de PCR NS3-NS4 dans le plasmide pIV250

10 Pour ce faire, on a effectué les étapes suivantes :

- Digestion enzymatique du plasmide pIV250 obtenu dans le point 2.1 ci-dessus par *Pst*I (dans React 2 Buffer, Invitrogen)/*Xba*I

- Digestion enzymatique du fragment PCR NS3/NS4 par *Pst*I/*Xba*I

- Ligature (T4 DNA Ligase), transformation bactérienne (souche TG1)

15 - Sélection des clones bactériens sur ampicilline (100 µg/ml)

- Maxi-préparation plasmidique (Qiagen) d'un clone positif après analyse de restriction (*Hind*III (dans React 2 Buffer, Invitrogen) : fragments de 4763 et 2789 pb ; *Sph*I (dans React 6 Buffer, Invitrogen) : 1534 et 5991 pb ; *Nco*I (dans React 3 Buffer, Invitrogen) : 2764 et 4761 pb)

20 - Obtention du plasmide de transfert contenant la séquence codant pour la polyprotéine NS3/NS4 sous le contrôle du promoteur ph5r (pIV327, figure 2D).

3 Préparation du plasmide pIV328 permettant l'expression de la protéine NS5b sous le contrôle du promoteur p7.5

3.1 Amplification par PCR de la séquence nucléotidique codant pour la protéine

25 NS5b

On a utilisé les oligonucléotides suivants :

oIV227 : 5'- GGG GGG GTC GAC ATG TCA ATG TCC TAC ACA TGG AC -3' (SEQ ID N°17)

oIV228 : 5'- GGG GGG GCA TGC TTA CCG GTT GGG GAG CAG GT -3' (SEQ ID

N°18)

et selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1, point 2.1 ci-dessus, à ceci près qu'on a utilisé une température de 52°C à la place de 62°C.

3.2 Obtention du plasmide

5 On a effectué les étapes suivantes :

- Digestion enzymatique du fragment PCR codant pour NS5b par *SalI/SphI*
- Digestion enzymatique de pTG186 (figure 2E, Transgène) par *SalI/SphI*
- Déphosphorylation du vecteur pTG186 (phosphatase alkaline ROCHE)
- Ligature (T4 DNA Ligase), transformation bactérienne (souche TG1)
- 10 - Sélection des clones bactériens sur ampicilline (100 µg/ml)
- Maxi-préparation plasmidique (Qiagen) d'un clone positif après analyse de restriction : (*HindIII* : fragments de 1984, 2627 et 4437 pb ; *BglII* : fragments de 321, 557, 1361, 1451, 2237 et 3121 pb ; *KpnI* (dans React 4 Buffer, Invitrogen) : fragments de : 2787 et 6261 pb)
- Obtention du plasmide de transfert contenant la séquence codant pour le polypeptide NS5b
- 15 sous le contrôle du promoteur p7.5 (pIV328, figure 2F)

4 Préparation des plasmides de transfert pIV329 et pIV344 permettant l'expression du gène codant pour la polyprotéine NS3/NS4 sous le contrôle du promoteur ph5r et du gène codant pour la protéine NS5b sous le contrôle du promoteur p7.5

20 Pour ce faire, on a mis en œuvre les étapes suivantes :

- Amplification par PCR de la séquence nucléotidique codant pour la protéine NS5b à partir du plasmide pIV328 obtenu dans le point 3.2 ci-dessus en utilisant les oligonucléotides suivants:

oIV229 : 5'- GGG GGG TCT AGA CCG GTA GTT CGC ATA TAC ATA -3' (SEQ ID

25 N°19)

oIV218 : 5'- GGG GGG TCT AGA TTA CCG GTT GGG GAG CAG GT-3' (SEQ ID N°14)

et selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1, point 2.1 ci-dessus, à ceci près qu'on a utilisé une température de 50°C à la place de 62°C

- Digestion enzymatique du fragment de PCR par *Xba*I
- Digestion enzymatique du plasmide pIV327 obtenu dans le point 2.3 ci-dessus par *Xba*I
- Ligature (T4 DNA Ligase), transformation bactérienne (souche TG1)
- Sélection des clones bactériens sur ampicilline (100 µg/ml)

5 - Maxi préparation plasmidique (Qiagen) de 2 clones positifs après analyse de restriction : (*Pst*I : pIV329 : fragments de 3033 et 6466 pb, pIV344 : 4641 et 4858 pb ; *Apal* (dans React 4 Buffer, Invitrogen) : pIV329 : 454, 960 et 8085 pb, pIV344 : 454, 1418 et 7627 pb ; *Nco*I : pIV329 : 4269, 469 et 4761 pb, pIV344 : 3053, 1685 et 4761 pb ; *Sma*I : pIV329 : 214, 2164, 1444 et 5677 pb, pIV344 : 214, 2164, 928 et 6193 pb)

10 - Obtention soit du plasmide de transfert permettant l'expression de la polyprotéine NS3/NS4 sous le contrôle du promoteur ph5r et de la protéine NS5b sous le contrôle du promoteur p7.5, les 2 cassettes d'expression étant orientées dans le même sens (pIV329, figure 2G), soit du plasmide de transfert permettant l'expression de la polyprotéine NS3/NS4 sous le contrôle du promoteur ph5r et de la protéine NS5b sous le contrôle du promoteur p7.5, les 2 cassettes d'expression étant orientées en sens opposés (pIV344, figure 2H).

15

5 Confirmation de l'expression des antigènes insérés dans les différents poxvirus

On a vérifié par Western blot, après infection de cellules Huh7 avec les poxvirus concernés, que les poxvirus pIV329 et pIV344, contenant les séquences codant pour la polyprotéine NS3NS4 et le polypeptide NS5b, exprimaient ces dits antigènes du VHC.

Exemple 3 : Mise en évidence de l'immunogénicité de la combinaison NS3/NS4 et NS5b

1 Immunisation des souris

25 On a immunisé des souris transgéniques HLA-A2.1, une fois, par injection intramusculaire d'au moins un adénovirus choisi parmi les adénovirus suivants :

- AdNS3NS4 préparé dans l'exemple 1 ci-dessus (point 2.3),
- AdNS5b préparé dans l'exemple 1 ci-dessus (point 3.3),

- AdNS5a préparé selon le mode opératoire de l'exemple 1, point 2, à ceci près qu'on a utilisé les amorces nucléotidiques suivantes pour amplifier la séquence nucléotidique codant pour le polypeptide NS5a (SEQ ID N°5 et 6) :

5 oIV172: 5'-GGG GGG GGT ACC ATG TCC GGC TCG TGG CTA AGG-3' (SEQ ID N°20),

oIV173: 5'-GGG GGG TCT AGA TTA GCA GCA GAC GAT GTC GTC-3' (SEQ ID N°21),

10 qu'on a remplacé dans la PCR la température de 62°C par 56°C, que la digestion enzymatique de pTG13387 et du fragment NS5a a été mise en œuvre par *KpnI/XbaI*, l'analyse de restriction par digestion par *SmaI* de pTG13387 donnant les fragments de 180 et 7251 pb et de pTG6624 donnant les fragments de 2263, 621, 5615, 180, 2463, 6480, 1398, 4456, 1455, 3540, 3386, 230 et 3685 pb

15 - AdCE1E2 selon le mode opératoire de l'exemple 1, point 2, à ceci près qu'on a utilisé les amorces nucléotidiques suivantes pour amplifier la séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine Core-E1-E2 (autrement appelée CE1E2) (SEQ ID N°7 et 8) :

16 oIV62: 5'-GGG GGG GCT AGC ATG AGC ACA AAT CCT AAA CCT-3' (SEQ ID N°22)

20 oIV68: 5'-GGG GGG TCT AGA TCA GGC CTC AGC CTG GGC TAT-3' (SEQ ID N°23),

25 qu'on a remplacé dans la PCR la température de 62°C par 56°C, que la digestion enzymatique de pTG13387 et du fragment CE1E2 a été mise en œuvre par *NheI/XbaI*, l'analyse de restriction par digestion par *SmaI* de pTG13387 donnant les fragments de 163, 435, 2270, 180 et 5254 pb et de pTG6624 donnant les fragments de 2263, 621, 3618, 163, 435, 2270, 180, 2463, 6480, 1398, 4456, 1455, 3540, 3386, 230 et 3685 pb,

25 - AdNS3NS4NS5b préparé dans l'exemple 1 ci-dessus (point 3) et - Ad β Gal (Transgène),

selon le protocole suivant :

- 10^9 pfu d'AdNS3NS4 ou
- 10^9 pfu d'AdNS5b ou

- 10^9 pfu d'AdCE1E2 ou
- 10^9 pfu d'AdNS3NS4 et 10^9 pfu d'AdNS5b ou
- 10^9 pfu d'AdNS3NS4, 10^9 pfu d'AdNS5b et 10^9 pfu d'AdNS5a
- 10^9 pfu d'AdNS3NS4, 10^9 pfu d'AdNS5b et 10^9 pfu d'AdCE1E2
- 5 - 10^9 pfu AdNS3NS4NS5b ou
- 10^9 pfu d'Ad β -Gal à titre de témoin.

Avant immunisation, on a vérifié, par Western blot, l'expression des antigènes du VHC et de β -Gal par les différents adénovirus utilisés pour l'immunisation.

2 Tests CTL et ELISPOT

10 Quinze jours après l'injection, on a analysé la réponse cellulaire en isolant les cellules de la rate (splénocytes) des souris et on a effectué un test CTL et un test ELISPOT comme suit :

Pour le test CTL, on a cultivé ces splénocytes en plaque 24 trous en présence de :

- $5 \mu\text{M}$ de l'épitope GLL (GLLGCITSL, SEQ ID N°24) dans le cas des splénocytes provenant de souris ayant reçu AdNS3NS4, $5 \mu\text{M}$ de l'épitope ALY (ALYDVVSTL, SEQ ID N°25) ou $5 \mu\text{M}$ de l'épitope KLQ (KLQDCTMLV, SEQ ID N°26) dans le cas des splénocytes provenant de souris ayant reçu AdNS5b ou de $5 \mu\text{M}$ de l'épitope DLM (DLMGYIPLV, SEQ ID N°27) dans le cas des splénocytes provenant de souris ayant reçu AdCE1E2, lesdits épitopes étant sous la forme de peptide synthétique (Eurogentex), et

20 - 10 U d'interleukine 2 recombinante murine (Brinster et al., Hepatology 2001) par ml dans du milieu minimum essentiel alpha (α MEM) pendant 5 jours. Au 5^{ème} jour, on a effectué l'étape de restimulation qui consiste à rajouter aux splénocytes en culture des splénocytes de souris naïves en présence desdits épitopes pendant 2 jours. Au 7^{ème} jour, on a réalisé le test CTL en lui-même qui consiste à mettre en présence les splénocytes des souris immunisées 25 après les 7 jours de culture (cellules effectrices) et des cellules EL4 S3-Rob HDD chargées avec $10 \mu\text{M}$ desdits épitopes et marquées au Cr⁵¹ (cellules cibles). On a déterminé l'activité cytotoxique spécifique des cellules effectrices par la mesure, après 4 h d'incubation avec les cellules cibles, du Cr⁵¹ libéré suite à la lyse des cellules cibles en utilisant un appareil de comptage γ -Cobra II (Packard, Rungis, France). On a déterminé la libération spontanée et

maximale à partir de puits contenant soit du milieu seul, soit du tampon de lyse (HCl 1N). On a calculé le pourcentage spécifique de cytotoxicité par la formule :

(libération dans l'essai – libération spontanée)/(libération maximale – libération spontanée) ×100. On a déterminé la lyse spécifique d'épitope par la différence entre le pourcentage de 5 lyse spécifique obtenu en présence ou en l'absence desdits épitopes.

On a effectué le test ELISPOT en cultivant les splénocytes pendant 48 h dans des plaques 96 puits Multiscreen (Millipore) préalablement « coatées » avec de l'anticorps anti-interféron gamma (IFN γ) (10 μ g/ml final). On a mis en culture les splénocytes en présence de 10 μ M des épitopes appropriés, comme indiqué ci-dessus, et de 10 U d'interleukine 2 10 recombinante murine par ml dans du α MEM. Pour le contrôle positif, on a cultivé les splénocytes en présence de concanavaline A (5 μ g/ml). Pour le contrôle négatif, on a cultivé les splénocytes soit en présence d'un peptide non spécifique appartenant à la protéine de 15 capsid du VHC, de séquence DLMGYIPLV (également appelé peptide irrelevant), soit en milieu seul sans épitope. On a lavé les puits à trois reprises, respectivement avec du PBS-Tween 0,05% puis du PBS, opération suivie d'une incubation de 2 h avec des anticorps anti-IFN γ de souris biotinylés. Après lavage, on a incubé les puits pendant 1 h avec un conjugué streptavidine-peroxydase de raifort et on a révélé l'activité enzymatique par dégradation du substrat AEC (aminoethylcarbazole). Les spots obtenus ont été comptés grâce à un lecteur ELISpot Zeiss (microscope Zeiss couplé au logiciel KS-ELISpot).

20 Les résultats sont indiqués sur les figures 3 à 5 sur lesquelles S correspond à souris et Souris neg correspond à la souris témoin.

Ces résultats mettent en évidence que

- l'AdNS3NS4 induit bien une réponse à médiation cellulaire spécifique des antigènes exprimés, comme illustré sur la figure 3A et 3B par la détection de lymphocytes T spécifiques 25 de l'épitope GLL contenu dans NS3.
- l'AdNS5b induit bien une réponse à médiation cellulaire spécifique des antigènes exprimés, comme illustré sur la figure 4 par la détection de lymphocytes T spécifiques de l'épitope ALY et KLQ contenus dans NS5b.

- l'AdCE1E2 induit bien une réponse à médiation cellulaire spécifique des antigènes exprimés, comme illustré sur la figure 5 par la détection de lymphocytes T spécifiques de l'épitope DLM contenus dans la protéine Core..

3 Test d'épreuve *in vivo* à l'aide d'un virus vaccine recombinant

5 Afin d'évaluer si les réponses immunes spécifiques induites par les différents adénovirus étaient capables d'induire une protection contre une épreuve infectieuse (« protection *in vivo* »), nous avons soumis les souris vaccinées à une telle épreuve.

La souris n'étant pas infectable directement par le VHC, nous avons utilisé, pour relier l'induction d'une réponse immunitaire spécifique et la résistance à une infection, un virus 10 vaccine recombinant (souche WR) codant pour les protéines non structurales du VHC (NS2 à NS5b) pour réaliser cette épreuve. Ce virus recombinant de la vaccine, après injection intra-péritonéale de 10^7 pfu à la souris, va se répliquer chez l'animal. La réplication de ce virus induit une réponse immunitaire à la fois spécifique des antigènes de la vaccine et spécifique des antigènes du VHC, comme il exprime aussi les protéines NS du VHC. Cette 15 réponse spécifique des antigènes du VHC sera d'autant plus efficace et vigoureuse que les souris auront déjà reçu un vaccin exprimant les antigènes du VHC. En d'autres termes, plus la vaccination (dans le cas présent réalisée avec les adénovirus recombinants) aura été efficace (c'est-à-dire que le système immun des souris aura été « primé » efficacement par le vaccin), plus la réponse anti-VHC générée après l'épreuve par le virus recombinant de la vaccine sera 20 forte et, par voie de conséquence, plus les souris seront « protégées » contre cette épreuve. En pratique, plus le taux résiduel de virus de la vaccine dans les souris sera faible, plus la protection ou la neutralisation due à la vaccination aura été efficace.

La neutralisation du virus vaccine reflète à la fois la réponse cellulaire induite par les protéines du VHC et par les protéines de la vaccine. La neutralisation est évaluée par titration 25 du virus vaccine résiduel à partir des ovaires des animaux comme suit : les ovaires sont prélevés à 4 jours post-épreuve, soniqués, congelés-décongelés 3 fois puis après centrifugation, des dilutions successives de surnageant sont titrées selon la technique des plages de lyse (Murata et al., PNAS, vol. 100, p.6753-6758) sur cellules Hutk-. Les titres viraux sont déterminés en pfu/ml/mg d'ovaire.

4 Mise en évidence d'une protection supérieure d'une vaccination combinant la polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b.

On a déterminé le titre de virus recombinant de la vaccine pour 4 groupes de 8 souris immunisées par les combinaisons d'adénovirus suivantes : AdNS3NS4 + AdNS5b (1^{er} groupe), AdNS3NS4 + AdNS5b + AdNS5a (2^{ème} groupe), AdNS3NS4 + AdNS5b + AdCE1E2 (3^{ème} groupe) et Ad β Gal (4^{ème} groupe).

Les résultats, donnés sur la figure 6, sont traités de façon statistique en se basant sur le test non paramétrique de Mann Whitney Wilcoxon (Méthodes Statistiques à l'usage des médecins et des biologistes, Collection Statistique en Biologie et en Médecine, Flammarion Médecine Sciences, (D. Schwartz), 1977) qui repose sur une comparaison des moyennes, et permet la comparaison des valeurs de deux échantillons x et y indépendants.

Ce test est mis en œuvre comme suit : l'ensemble des valeurs des deux groupes x et y à comparer est classé de façon croissante. Un rang est ensuite attribué à chaque valeur, et la somme des rangs est effectuée. On obtient alors Wx et Wy . On calcule alors une valeur de référence appelée $(Wx)_t$ (valeur théorique dans l'hypothèse nulle où Wx n'est pas différent de Wy) et liée par le rapport : $n(N+1)/2$, avec n = nombre de souris testées dans le groupe x et N = nombre de souris testées dans les groupes x et y .

Si Wx est inférieur à $(Wx)_t$ (taux résiduel de virus de la vaccine dans les souris faible), alors on peut conclure que la neutralisation due à la vaccination est significativement efficace.

Si nous prenons l'exemple du groupe AdNS3NS4S5b noté x comparé au groupe Ad β Gal noté y , nous obtenons les valeurs suivantes :

$$Wx = 1+2+4+6+8+11+13+14 = 59 \text{ (8 souris testées)}$$

$$Wy = 3+5+7+9+10+12+15+16 = 77 \text{ (8 souris testées)}$$

Sous l'hypothèse nulle, Wx n'est pas différent de Wy , la valeur attendue est : $(Wx)_t = (1/2)*8*17 = 68$

$Wx < (Wx)_t$ ce qui signifie que les valeurs obtenues dans le groupe AdNS3NS4NS5b sont plus petites que celles obtenues dans le groupe Ad β Gal et que la neutralisation due à la vaccination est significativement efficace.

Les valeurs statistiques pour les autres groupes de souris sont indiquées dans le

tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1

Groupe/Ad β Gal	W _x	(W _x) _t
AdNS3NS4+NS5b	52	68
AdNS3NS4+NS5b+ NS5a	68	68
AdNS3NS4+NS5b+ CE1E2	74	68

Les valeurs dans le tableau 1 ci-dessus montrent que seule une vaccination des souris 5 par la combinaison des Adénovirus NS3NS4 et adénovirus NS5b est capable d'induire une neutralisation significative de la réplication du virus de la vaccine utilisé dans l'épreuve par rapport au groupe de souris contrôle vacciné par l'Ad β Gal. Les vaccinations réalisées en utilisant les combinaisons comprenant (AdNS3NS4 + AdNS5b + AdNS5a) ou (AdNS3/NS4 + AdNS5b + AdCE1E2), n'aboutissent pas à une différence significative par rapport au groupe de souris contrôle immunisé par Ad β Gal.

Ces résultats permettent donc de mettre en évidence, de façon inattendue, la protection supérieure d'une vaccination combinant la polyprotéine NS3NS4 et le polypeptide NS5b.

5 Confirmation de la protection d'une vaccination combinant la polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b exprimés conjointement par un même vecteur

On a déterminé le titre de virus recombinant de la vaccine pour 3 groupes de 8 souris immunisées par les combinaisons d'adénovirus suivantes : AdNS3NS4NS5b (1^{er} groupe), AdNS3NS4 + AdNS5b (2^{ème} groupe) et Ad β Gal (3^{ème} groupe).

Les résultats, donnés sur la figure 7, sont traités de façon statistique en se basant sur 20 le test non paramétrique de Mann Whitney Wilcoxon comme décrit dans l'expérience précédente.

Les valeurs statistiques pour les groupes 1 et 2 comparées au groupe contrôle

Ad β Gal sont indiquées dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2

Groupe/Ad β Gal	W _r	(W _r) _t
AdNS3NS4NS5b	49	68
AdNS3NS4+NS5b	53	68

Les valeurs dans le tableau 2 ci-dessus montrent que la vaccination des souris par un adénovirus codant à la fois pour les trois antigènes NS3, NS4 et NS5b, tout comme la combinaison des Adénovirus NS3NS4 et Adénovirus NS5b, est capable d'induire une neutralisation significative de la réplication du virus de la vaccine utilisé dans l'épreuve par rapport au groupe de souris contrôle vacciné par l'Adéno β Gal. Ce résultat confirme la protection d'une vaccination combinant la polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NS5b exprimés conjointement par un même vecteur.

REVENDICATIONS

1. Composition peptidique caractérisée en ce qu'elle comprend une polyprotéine NS3/NS4 du virus de l'hépatite C, ainsi qu'un polypeptide NS5b du virus de l'hépatite C.

5

2. Composition peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que NS3 et/ou NS4 et/ou NS5b proviennent de virus de génotypes différents.

3. Composition peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que NS3, 10 NS4 et NS5b proviennent d'un virus de même génotype, de préférence de génotype 1b.

4. Vecteur d'expression caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide NS5b, ainsi que les moyens nécessaires à leur expression.

15

5. Vecteur d'expression selon la revendication 4, caractérisé en ce que les séquences nucléotidiques codent pour une polyprotéine et un polypeptide issus de virus de génotypes différents.

20

6. Vecteur d'expression selon la revendication 4, caractérisé en ce que les séquences nucléotidiques codent pour une polyprotéine et un polypeptide issus d'un virus de même génotype, de préférence le génotype 1b.

25

7. Vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé

en ce que ce vecteur est un adénovirus.

8. Vecteur d'expression selon la revendication 7, caractérisé en ce que le génome de l'adénovirus est modifié de façon à remplacer la région E1 par la cassette d'expression CMV-NS3-NS4 et à remplacer la région E3 par la cassette d'expression SV40-NS5b.

9. Vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que ce vecteur est un poxvirus.

5 10. Vecteur d'expression selon la revendication 9, caractérisé en ce que le génome du poxvirus est modifié de façon à insérer la cassette d'expression ph5r-NS3-NS4 et à insérer la cassette d'expression p7.5-NS5b.

11. Microorganisme ou cellule hôte transformé par un vecteur d'expression tel que 10 défini dans l'une quelconque des revendications 4 à 10.

12. Utilisation d'une composition peptidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou bien d'un vecteur d'expression tel que défini dans l'une quelconque des revendications 4 à 10, ou bien d'un vecteur d'expression comprenant une 15 séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide NS5b, ou bien des séquences nucléotidiques codant pour ladite polyprotéine NS3/NS4 et ledit polypeptide NS5b, lesdites séquences nucléotidiques correspondant aux séquences contenues dans les vecteurs d'expression tels que définis dans l'une quelconque des revendications 4 à 10, 20 placées sous le contrôle d'éléments nécessaires à une expression constitutive et/ou inductible desdits peptides, pour la préparation d'un médicament destiné à l'inhibition, la prévention ou le contrôle d'une infection provoquée par le virus de l'hépatite C chez un animal, de préférence l'homme.

25 13. Composition pharmaceutique, notamment vaccin, comprenant à titre de substance active la composition peptidique telle que définie dans les revendications 1 à 3, ou bien un vecteur d'expression tel que défini dans l'une quelconque des revendications 4 à 10, ou bien un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine

NS3/NS4 avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide.

14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle 5 comprend également un véhicule pharmaceutiquement approprié.

15. Kit pharmaceutique, notamment vaccinal, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et au moins un vecteur d'expression comprenant une séquence 10 nucléotidique codant pour le polypeptide NS5b.

16. Kit pharmaceutique, notamment vaccinal, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un vecteur d'expression tel que défini dans la revendication 7 ou 8 et au moins un vecteur d'expression tel que défini la revendication 9 ou 10.

15

17. Kit pharmaceutique, notamment vaccinal, comprenant au moins un vecteur d'expression tel que défini dans l'une quelconque des revendications 4 à 10, ou bien au moins un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour 20 le polypeptide NS5b, et

- (i) au moins une composition peptidique telle que définie dans les revendications 1 à 3 ou
- (ii) au moins une séquence nucléotidique codant pour la polyprotéine NS3/NS4 et pour le polypeptide NS5b.

25

1/17

Figure 1

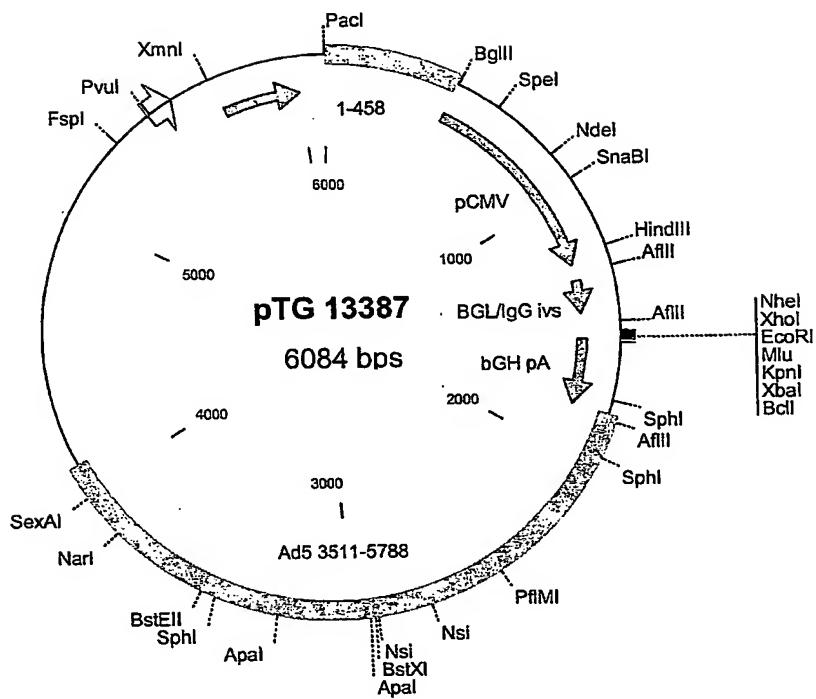


Figure 1A

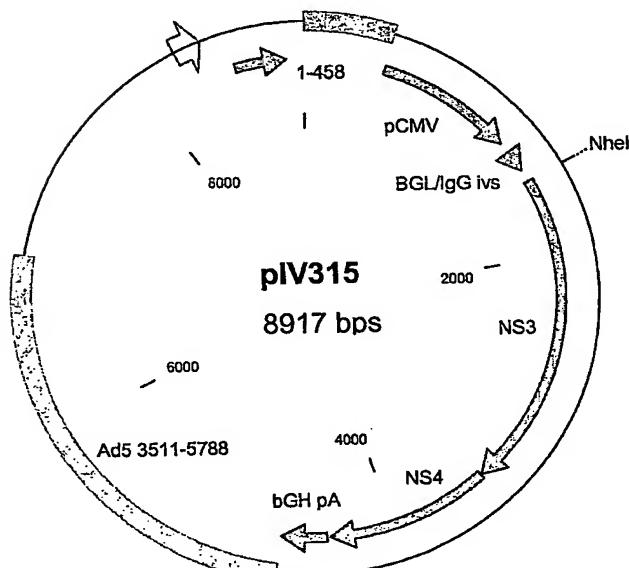


Figure 1B

2/17

Figure 1 (suite)

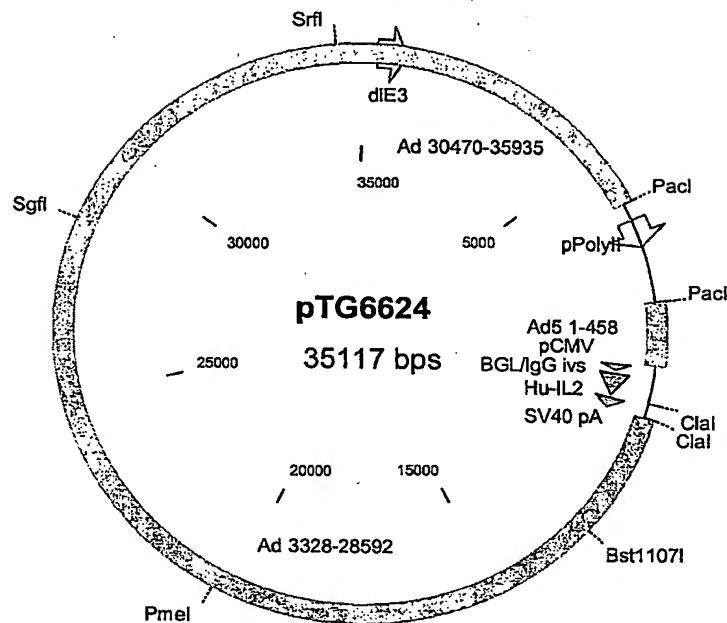


Figure 1C

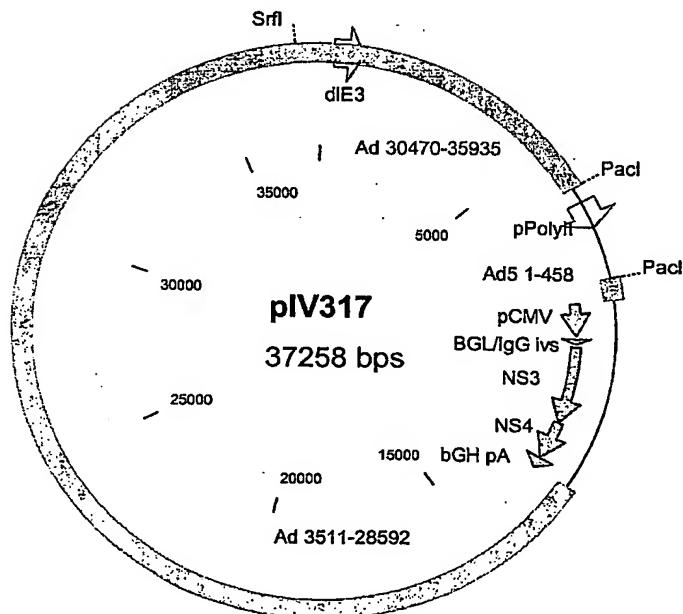


Figure 1D

3/17

Figure 1 (suite)

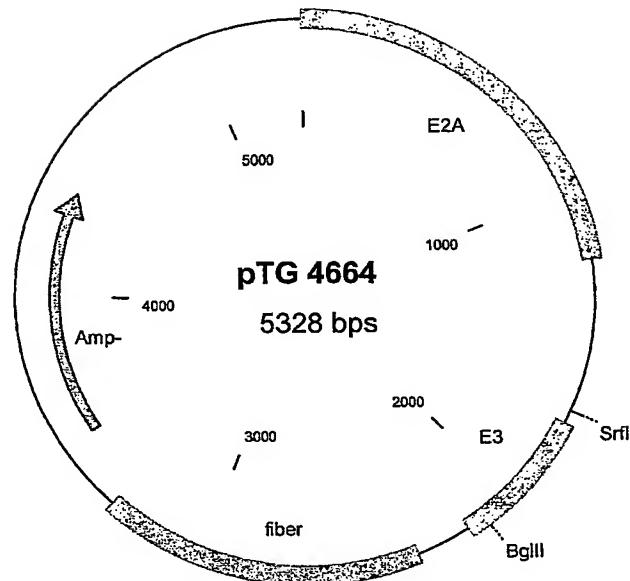


Figure 1E

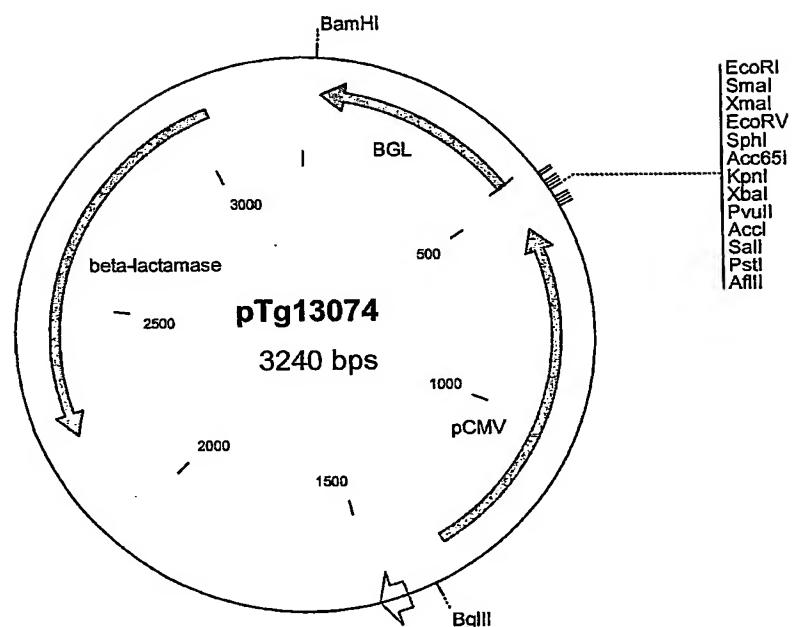


Figure 1F

4/17

Figure 1 (suite)

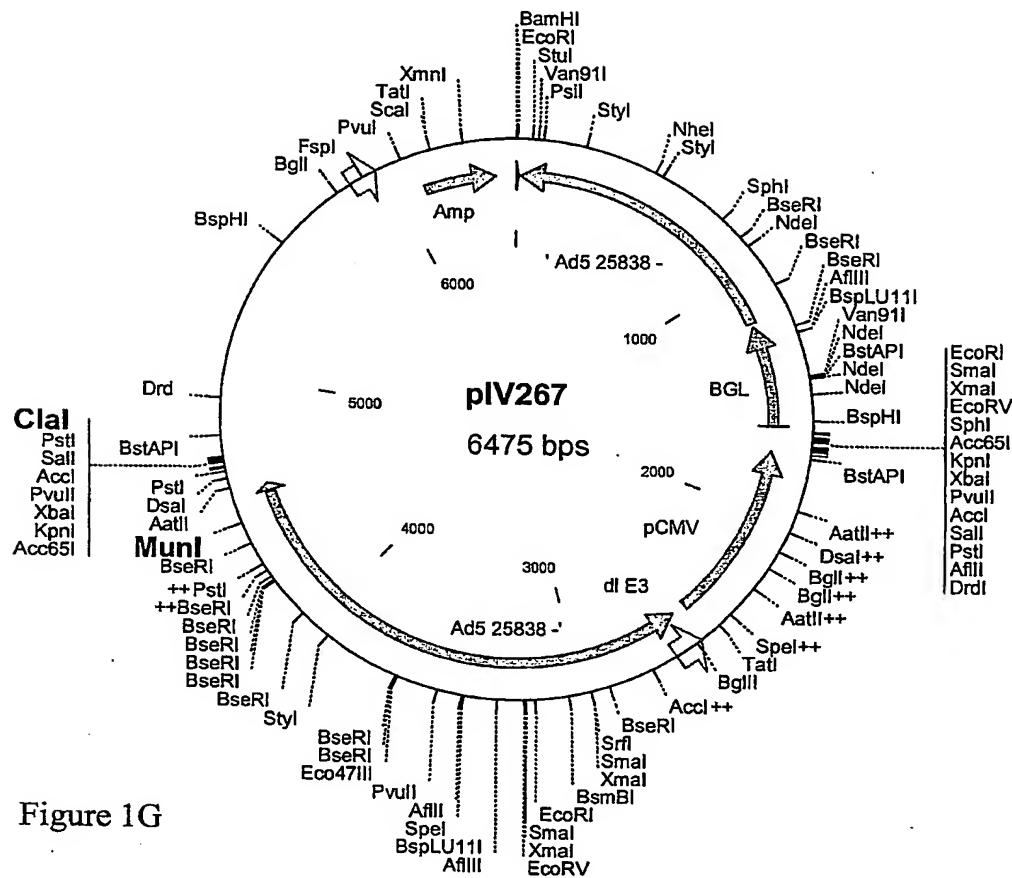


Figure 1G

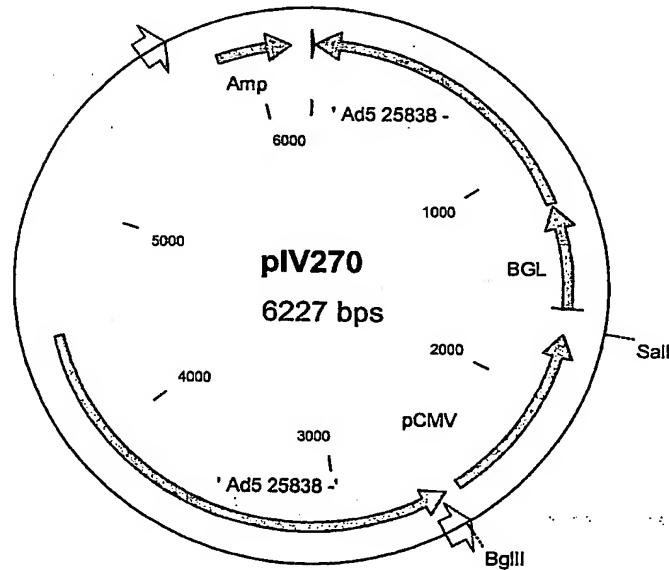


Figure 1H

5/17

Figure 1 (suite)

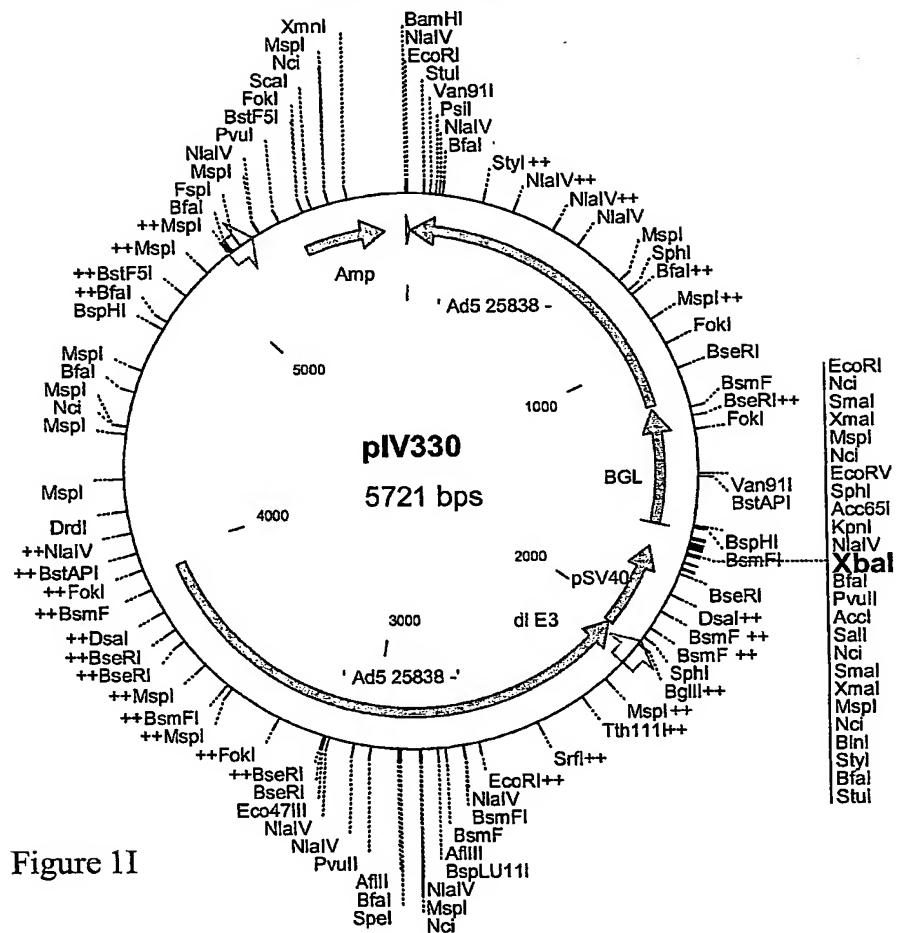


Figure 11

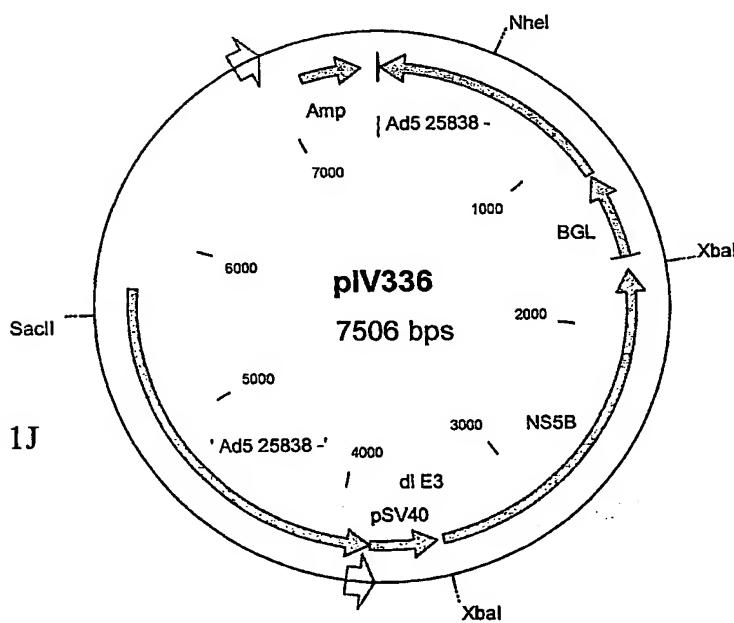


Figure 1J

6/17

Figure 1 (suite)

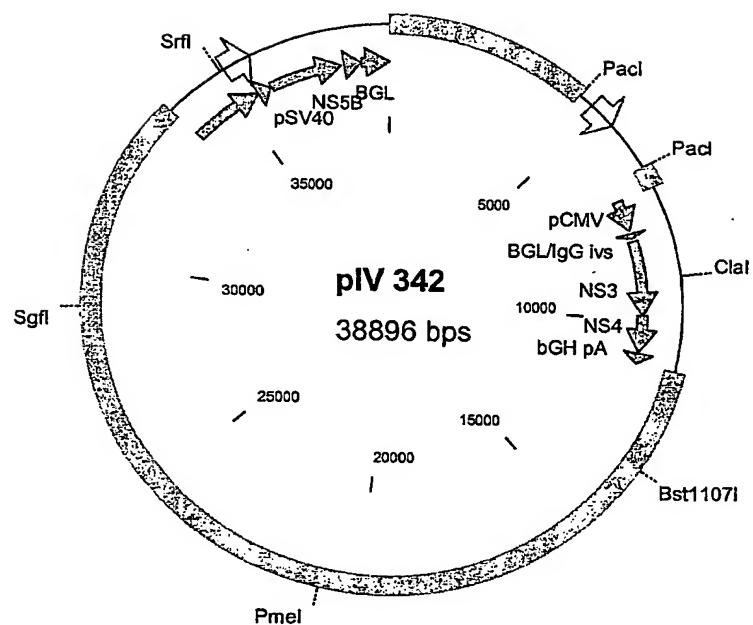


Figure 1K

7/17

Figure 2

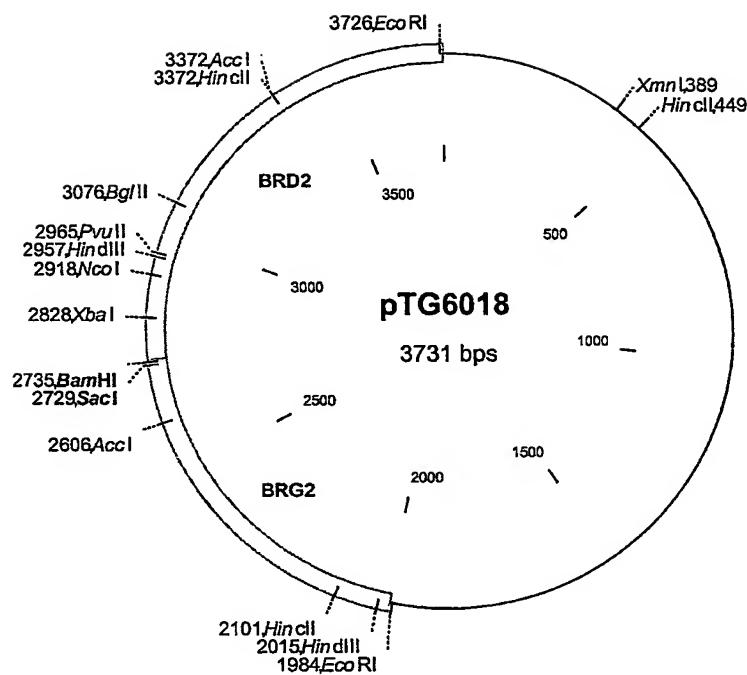


Figure 2A

8/17

Figure 2 (suite)

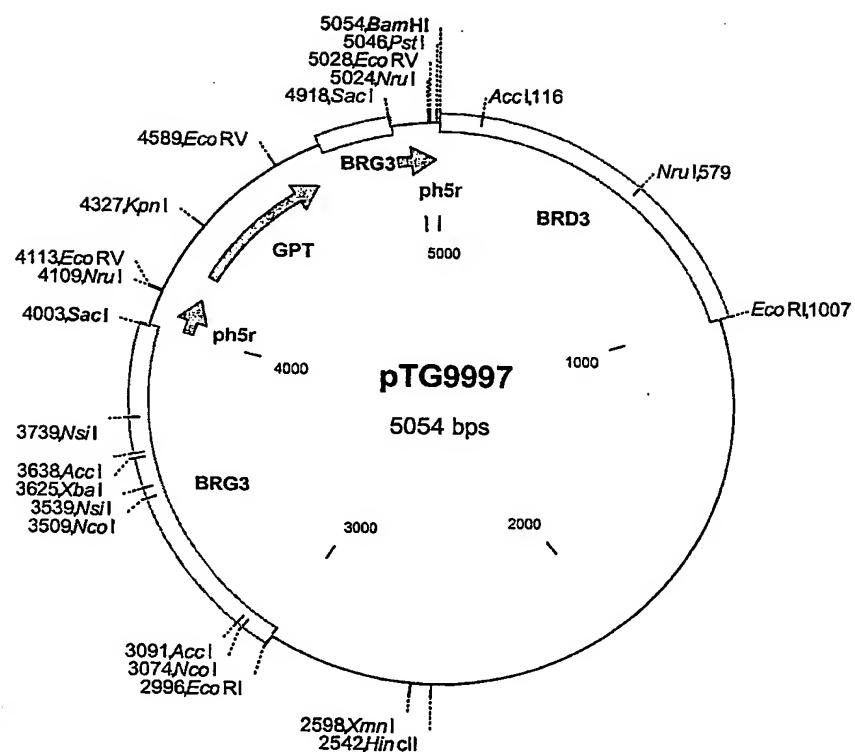


Figure 2B

9/17

Figure 2 (suite)

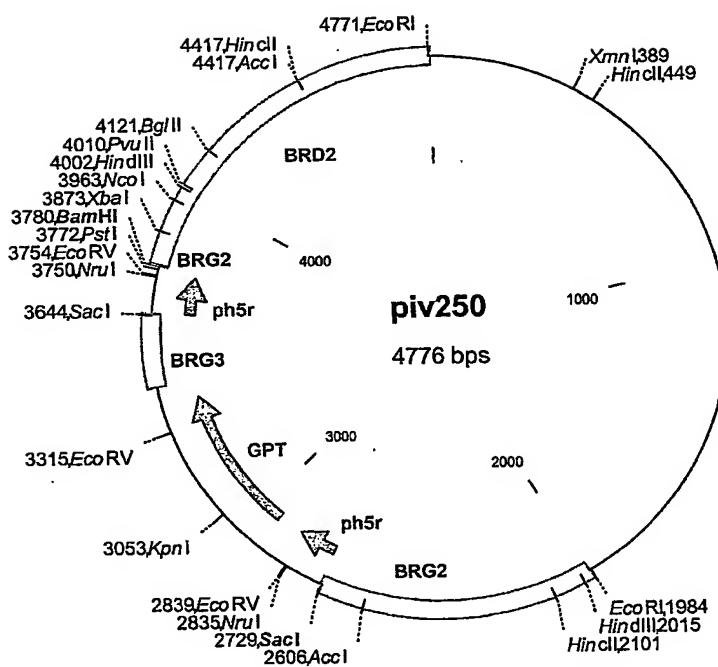


Figure 2C

10/17

Figure 2 (suite)

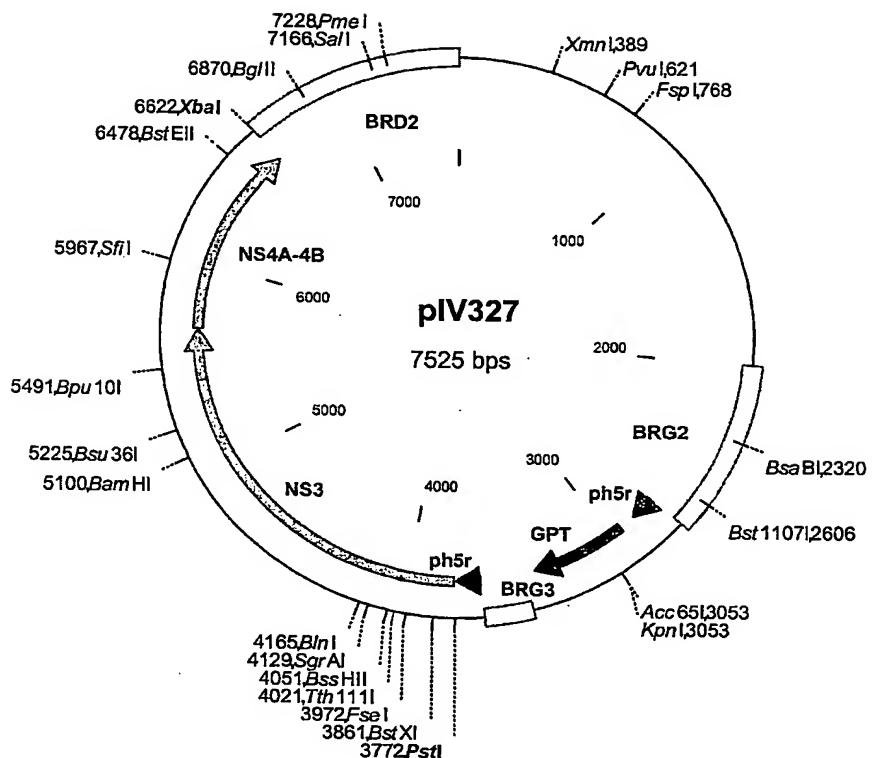


Figure 2D

11/17

Figure 2 (suite)

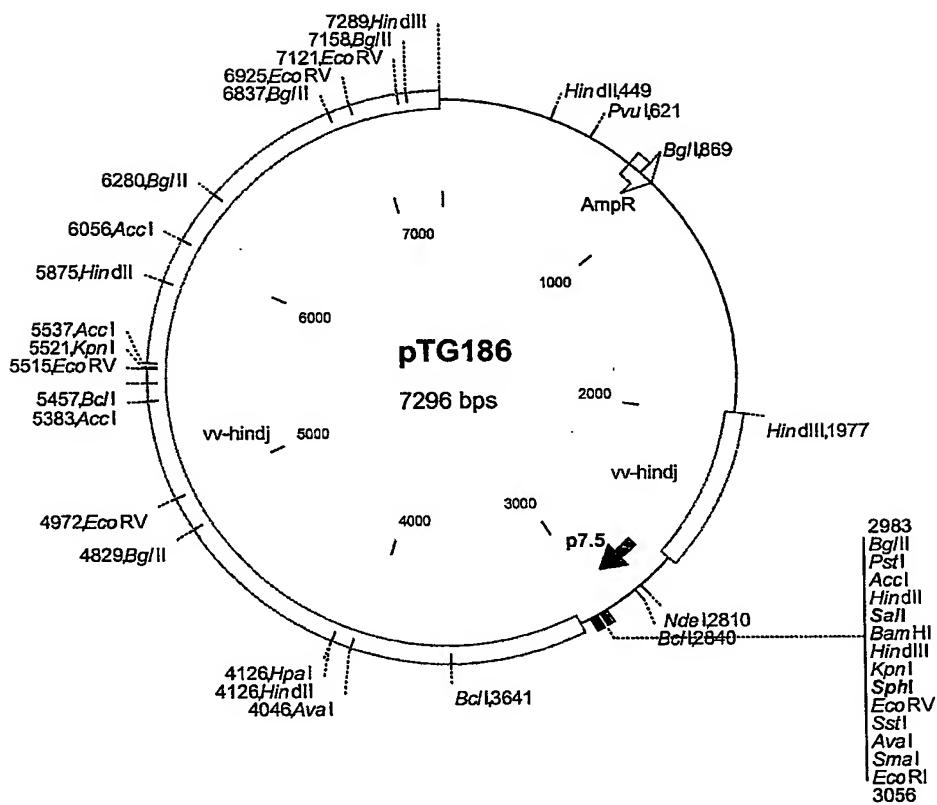


Figure 2E

12/17

Figure 2 (suite)

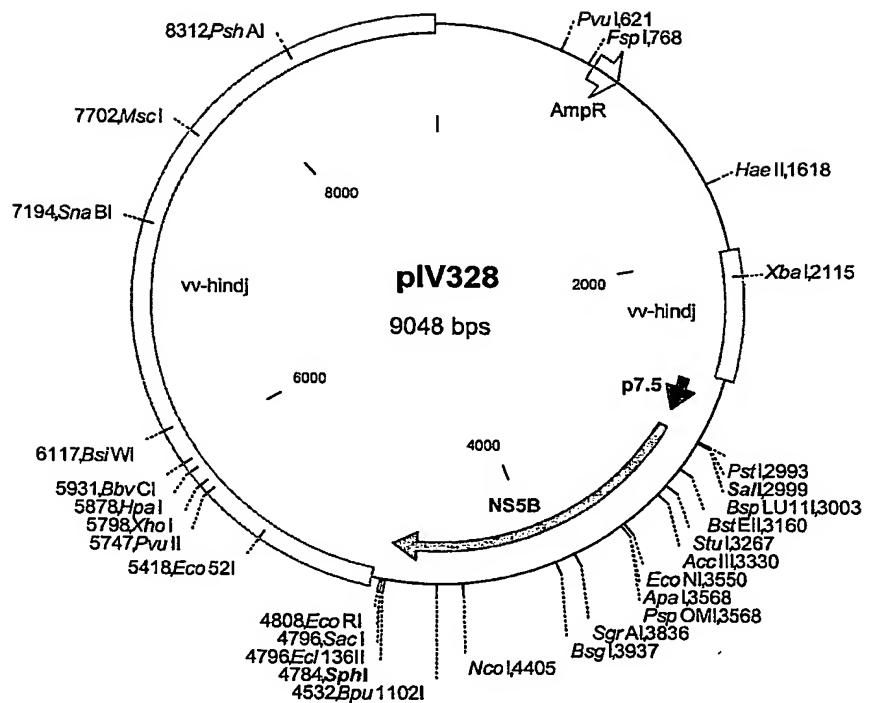


Figure 2F

13/17

Figure 2 (suite)

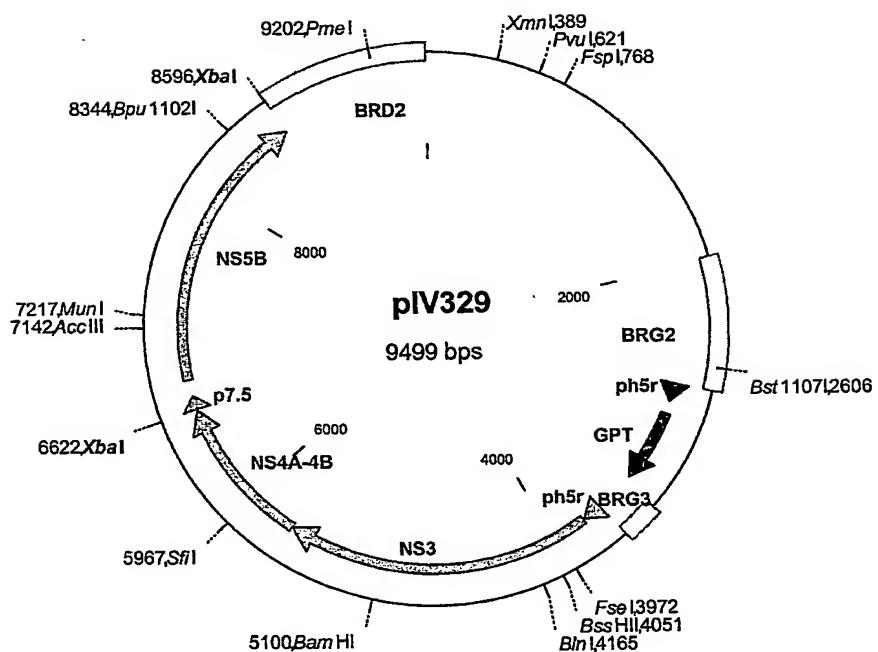


Figure 2G

14/17

Figure 2 (suite)

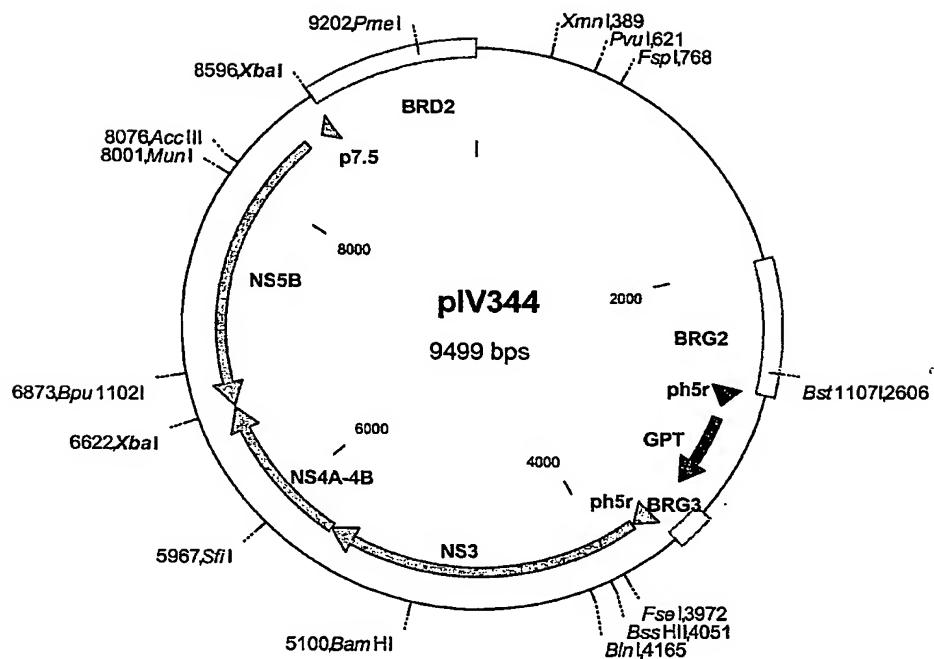


Figure 2H

15/17

Figure 3

BEST AVAILABLE COPY

Figure 3A

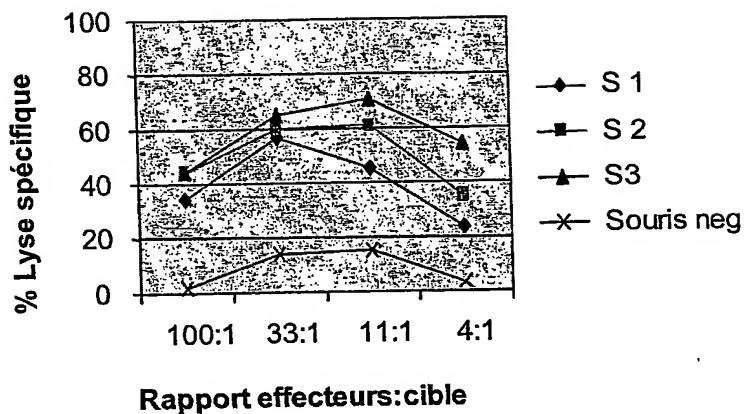


Figure 3B

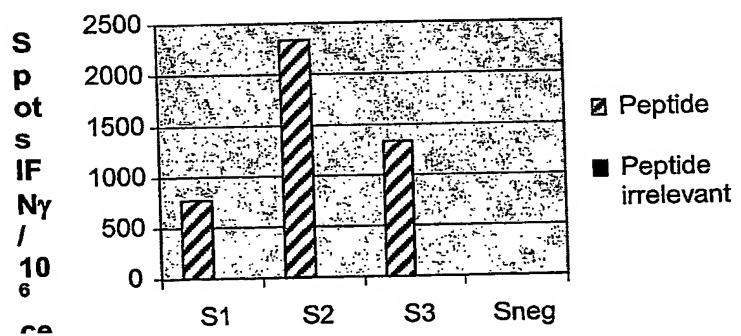


Figure 4

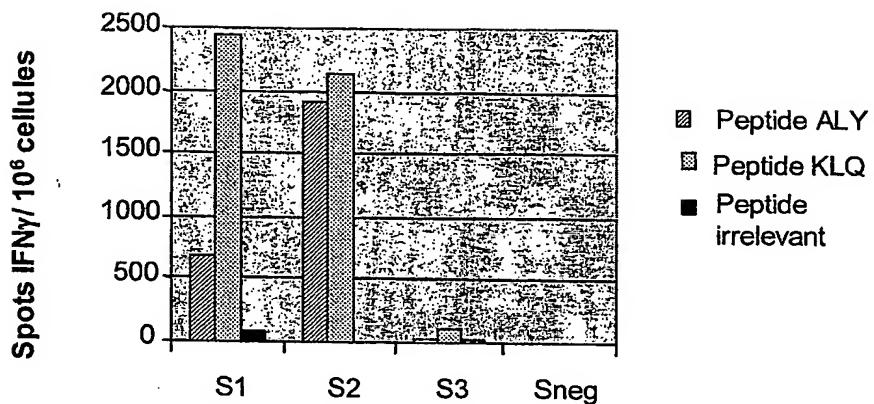
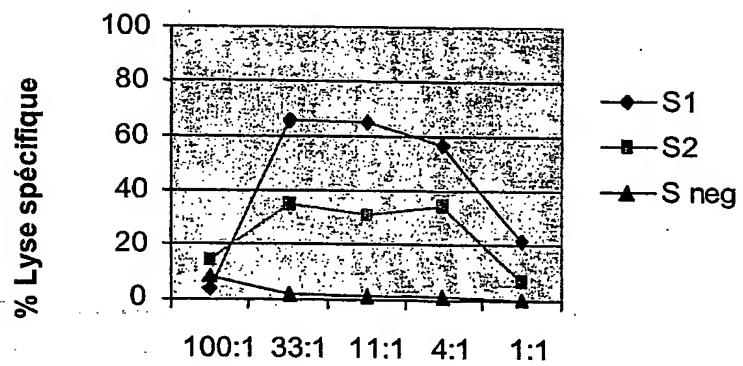


Figure 5



17/17

Figure 6

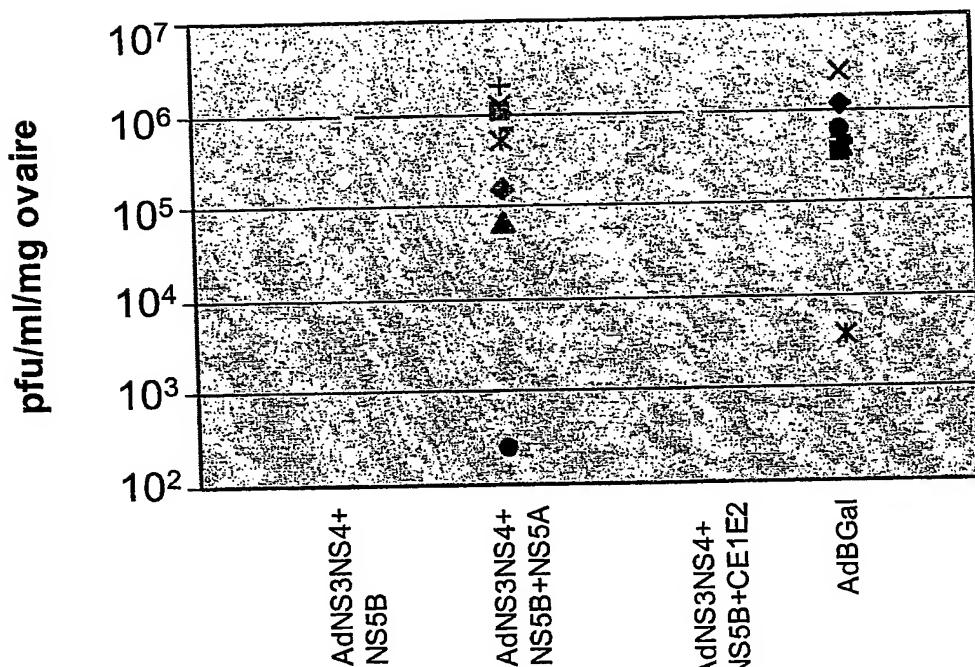
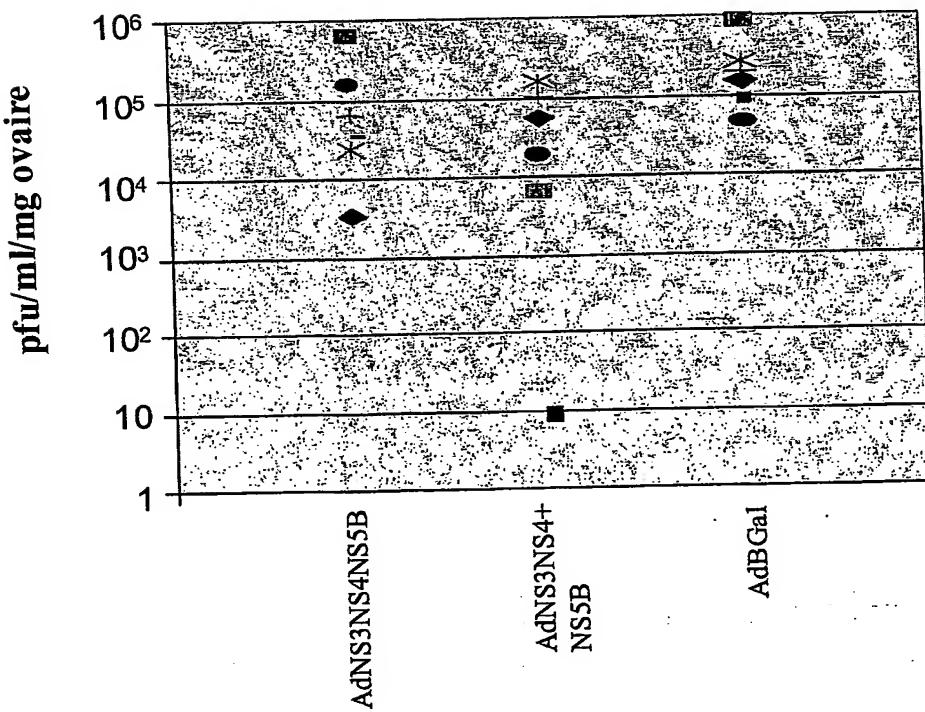


Figure 7



WO 2004/111082

PCT/FR2004/050214

1

SEQUENCE LISTING

<110> BIOMERIEUX
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

<120> Composition comprenant la polyprotéine NS3/NS4 et le polypeptide NSSb du VHC, vecteurs d'expression incluant les séquences nucléiques correspondantes et leur utilisation en thérapeutique

<130> ADENOVIR

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2844

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> séquence codant pour NS3NS4

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2844)

<223>

<400> 1

atg gcg cct atc acg gcc tat tcc caa caa acg cgg ggc ctg ctt ggc 48
Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
1 5 10 15

tgt atc atc act agc ctc aca ggt cgg gac aag aac cag gtc gat ggg 96
Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Asp Gly
20 25 30

gag gtt cag gtg ctc tcc acc gca acg caa tct ttc ctg gcg acc tgc 144
Glu Val Gln Val Leu Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys
35 40 45

gtc aat ggc gtg tgt tgg acc gtc tac cat ggt gcc ggc tcg aag acc 192
Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr
50 55 60

ctg gcc ggc ccc aag ggt cca atc acc caa atg tac acc aat gta gac 240
Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65 70 75 80

cag gac ctc gtc ggc tgg ccc ccc ggg ggc cgc tcc atg aca 288
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr
85 90 95

ccg tgc acc tgc ggc agc tcg gac ctt tac ttg gtc acg agg cat gcc 336
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
100 105 110

gat gtc att ccg gtg cgc cgg cga ggc gac agc agg ggg agt cta ctc 384
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
115 120 125

tcc cct agg ccc gtc tcc tac ctg aag ggc tcc tcg ggt gga cca ctg Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu 130 135 140	432
ctt tgc cct tcg ggg cac gtt gta ggc atc ttc cgg gct gct gtg tgc Leu Cys Pro Ser Gly His Val Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys 145 150 155 160	480
acc cgg ggg gtt gcg aag gcg gtc ata ccc gtt gag tct atg Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met 165 170 175	528
gaa act acc atg cgg tct ccg gtc ttc aca gac aac tca tcc cct ccg Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro 180 185 190	576
gcc gta ccg caa aca ttc caa gtg gca cat tta cac gct ccc act ggc Ala Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly 195 200 205	624
agc ggc aag agc acc aaa gtg ccg gct gca tat gca gcc caa ggg tac Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr 210 215 220	672
aag gtg ctc gtc cta aac ccg tcc gtt gct gcc aca ttg ggc ttt gga Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly 225 230 235 240	720
gcg tat atg tcc aag gca cat ggc atc gag cct aac atc aga act ggg Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Glu Pro Asn Ile Arg Thr Gly 245 250 255	768
gta agg acc atc acc acg ggc ggc ccc atc acg tac tcc acc tat ggc Val Arg Thr Ile Thr Gly Gly Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly 260 265 270	816
aag ttc ctt gcc gac ggt gga tgc tcc ggg ggc gcc tat gac atc ata Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile 275 280 285	864
ata tgt gac gaa tgc cac tca act gac tgg aca acc atc ttg ggc atc Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Trp Thr Thr Ile Leu Gly Ile 290 295 300	912
ggc aca gtc ctg gat cag gca gag acg gct gga ggc cgg ctc gtc gtg Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val 305 310 315 320	960
ctc gcc acc gcc acg cct ccg gga tcg atc acc gtg cca cac ccc aac Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Ile Thr Val Pro His Pro Asn 325 330 335	1008
atc gag gaa gtg gcc ctg tcc aac act ggg gag att ccc ttc tat ggc Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly 340 345 350	1056
aaa gcc atc ccc att gag gcc atc aag ggg gga agg cat ctc atc ttc Lys Ala Ile Pro Ile Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe 355 360 365	1104

tgc cat tcc aag aag aag tgt gac gag ctc gcc gca aag ctg aca ggc Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Thr Gly 370 375 380	1152
ctc gga ctc aat gct gta gcg tat tac cgg ggt ctc gat gtg tcc gtc Leu Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val 385 390 395 400	1200
ata ccg act agc gga gac gtc gtt gtc gtg gca aca gac gct cta atg Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met 405 410 415	1248
acg ggc ttt acc ggc gac ttt gac tca gtg atc gac tgc aac aca tgt Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys 420 425 430	1296
gtc acc cag aca gtc gat ttc agc ttg gat ccc acc ttc acc att gag Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu 435 440 445	1344
acg aca acc gtg ccc caa gac gcg gtg tcg cgc tcg cag cgg cga ggt Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly 450 455 460	1392
agg act ggc agg ggc agg agt ggc atc tac agg ttt gtg act cca gga Arg Thr Gly Arg Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro Gly 465 470 475 480	1440
gaa cgg ccc tca ggc atg ttc gac tcc tcg gtc ctg tgt gag tgc tat Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr 485 490 495	1488
gac gca ggc tgc gct tgg tat gag ctc acg ccc gct gag act aca gtc Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val 500 505 510	1536
agg ttg cgg gct tac ctg aat aca cca ggg ttg ccc gtc tgc cag gac Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp 515 520 525	1584
cat ctg gag ttc tgg gaa agc gtc ttc aca ggc ctc acc cac ata gat His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp 530 535 540	1632
gcc cac ttc ctg tcc caa acc aag cag gca gga gac aac ttc ccc tac Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr 545 550 555 560	1680
ctg gtg gca tac caa gcc acg gtg tgc gcc agg gct cag gct cca cct Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro 565 570 575	1728
cca tcg tgg gat caa atg tgg aag tgt ctc ata cgg ctt aaa cct acg Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr 580 585 590	1776
ctg cac ggg cca aca ccc ctg ctg tat agg cta gga gcc gtt caa aat Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn 595 600 605	1824

gag atc acc ctc aca cat ccc ata acc aaa ttc gtc atg gca tgc atg Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Phe Val Met Ala Cys Met 610 615 620	1872
tcg gcc gac ctg gag gtc gtc act agc acc tgg gtg ctg gta ggc gga Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly 625 630 635 640	1920
gtc ctt gca gct ctg gcc gca tat tgc ctg aca acc ggt agt gtg gtc Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val 645 650 655	1968
att gtg ggt agg atc att ttg tcc ggg agg ccg gct gtt gtt ccc gac Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Val Val Pro Asp 660 665 670	2016
agg gaa gtc ctc tac cgg gag ttc gat gaa atg gaa gag tgc gcc tca Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser 675 680 685	2064
cac ctc cct tac atc gag caa gga atg cag ctc gcc gag cag ttc aag His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys 690 695 700	2112
cag cag gca ctc ggg ttg ctg caa aca gcc acc aag caa gcg gag gcc Gln Gln Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala 705 710 715 720	2160
gct gct ccc gtg gtg gag tcc agg tgg ccg gcc ctt gag gcc ttc tgg Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Arg Trp Arg Ala Leu Glu Ala Phe Trp 725 730 735	2208
gca aag cac atg tgg aac ttc atc agc ggg ata cag tac tta gca ggc Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly 740 745 750	2256
tta tcc act ctg cct ggg aac ccc gcg ata gca tca ctg atg gca ttc Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe 755 760 765	2304
aca gcc tct atc acc agt ccg ctc acc acc cag aat acc ctc cta ttc Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln Asn Thr Leu Leu Phe 770 775 780	2352
aac atc tta ggg gga tgg gtg gct gct caa ctc gct cct ccc agt gct Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala 785 790 795 800	2400
gct tcg gcc ttc gtg ggt gcc ggc att gcc ggt gcg gcc att ggc agc Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Ile Gly Ser 805 810 815	2448
ata ggc ctt ggg aag gtg ctt gtg gac att ctg gcg ggc tat gga gcg Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala 820 825 830	2496
ggg gtg gcc ggt gca ctc gtg gct ttt aag gtc atg agc ggc gag gcg Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Ala 835 840 845	2544

ccc tcc gcc gag gac ctg gtt aac ttg ctc cct gcc atc ctc tcc ccc Pro Ser Ala Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro 850 855 860	2592
ggc gcc ttg gtc gtc ggg atc gtg tgt gca gca atc ctg cgt cgg cac Gly Ala Leu Val Val Gly Ile Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His 865 870 875 880	2640
gtg ggc ccg gga gag ggg gct gtg cag tgg atg aac cgg ctg ata gcg Val Gly Pro Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala 885 890 895	2688
tcc gct tcg cgg ggt aac cac gtt tcc ccc acg cac tac gtg cct gag Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu 900 905 910	2736
agc gac gcc gca gca cgt gta act cag atc ctc tcc agc ctc acc atc Ser Asp Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr Ile 915 920 925	2784
act cag ctg ctg aag agg ctt cac cag tgg att aat gag gac tgc tcc Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys Ser 930 935 940	2832
acg cca tgc taa Thr Pro Cys 945	2844

<210> 2
<211> 947
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> séquence codant pour NS3NS4

<400> 2

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly 1 5 10 15
Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Asp Gly 20 25 30
Glu Val Gln Val Leu Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys 35 40 45
Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr 50 55 60
Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp 65 70 75 80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr 85 90 95
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala 100 105 110

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
115 120 125

Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
130 135 140

Leu Cys Pro Ser Gly His Val Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met
165 170 175

Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro
180 185 190

Ala Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
195 200 205

Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
210 215 220

Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly
225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Glu Pro Asn Ile Arg Thr Gly
245 250 255

Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
260 265 270

Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
275 280 285

Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Trp Thr Thr Ile Leu Gly Ile
290 295 300

Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val
305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Ile Thr Val Pro His Pro Asn
325 330 335

Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
340 345 350

Lys Ala Ile Pro Ile Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
355 360 365

Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Thr Gly
370 375 380

Leu Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
385 390 395 400

Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
405 410 415

Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys
420 425 430

Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
435 440 445

Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly
450 455 460

Arg Thr Gly Arg Gly Arg Ser Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro Gly
465 470 475 480

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
485 490 495

Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
500 505 510

Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
515 520 525

His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
530 535 540

Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr
545 550 555 560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
565 570 575

Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
580 585 590

Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
595 600 605

Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Phe Val Met Ala Cys Met
610 615 620

Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
625 630 635 640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val
645 650 655

Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Val Val Pro Asp
660 665 670

Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser
675 680 685

His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys
690 695 700

Gln Gln Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala
705 710 715 720

Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Arg Trp Arg Ala Leu Glu Ala Phe Trp
725 730 735

Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly
740 745 750

Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe
 755 760 765
 Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln Asn Thr Leu Leu Phe
 770 775 780
 Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala
 785 790 795 800
 Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Ile Gly Ser
 805 810 815
 Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala
 820 825 830
 Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Ala
 835 840 845
 Pro Ser Ala Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro
 850 855 860
 Gly Ala Leu Val Val Gly Ile Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His
 865 870 875 880
 Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala
 885 890 895
 Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu
 900 905 910
 Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr Ile
 915 920 925
 Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys Ser
 930 935 940
 Thr Pro Cys
 945

<210> 3
 <211> 1779
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> séquence codant pour NS5b

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1779)
 <223>

 <400> 3
 atg tca atg tcc tac aca tgg aca ggt gcc ttg atc acg cca tgc gct
 Met Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ala
 1 5 10 15
 gcg gag gag agc aag ttg ccc atc aat ccg ttg agc aac tct ttg ctg
 Ala Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu
 20 25 30

48

96

cgt cac cac agt atg gtc tac tcc aca aca tct cgc agc gca agt ctg Arg His His Ser Met Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Ser Leu 35 40 45	144
cgg cag aag aag gtc acc ttt gac aga ctg caa gtc ctg gac gac cac Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Asp His 50 55 60	192
tac cgg gac gtg ctc aag gag atg aag gcg aag gcg tcc aca gtt aag Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys 65 70 75 80	240
gct agg ctt cta tct ata gag gag gcc tgc aaa ctg acg ccc cca cat Ala Arg Leu Leu Ser Ile Glu Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro His 85 90 95	288
tcg gcc aaa tcc aaa ttt ggc tac ggg gcg aag gac gtc cgg agc cta Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Ser Leu 100 105 110	336
tcc agc agg gcc gtc aac cac atc cgc tcc gtg tgg gag gac ttg ctg Ser Ser Arg Ala Val Asn His Ile Arg Ser Val Trp Glu Asp Leu Leu 115 120 125	384
gaa gac act gaa aca cca att gat acc acc atc atg gca aaa aat gag Glu Asp Thr Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu 130 135 140	432
gtt ttc tgc gtc caa cca gag aaa gga ggc cgc aag cca gct cgc ctt Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu 145 150 155 160	480
atc gta ttc cca gac ctg ggg gta cgt gta tgc gag aag atg gcc ctt Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu 165 170 175	528
tac gac gtg gtc tcc acc ctt cct cag gcc gtg atg ggc ccc tca tac Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Pro Ser Tyr 180 185 190	576
gga ttc cag tac tct cct ggg cag cgg gtc gag ttc ctg gtg aat acc Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Thr 195 200 205	624
tgg aaa tca aag aaa tgc cct atg ggc ttc tca tat gac acc cgc tgc Trp Lys Ser Lys Lys Cys Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys 210 215 220	672
ttt gac tca acg gtc act gag aat gac atc cgt act gag gag tca atc Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ser Ile 225 230 235 240	720
tac caa tgt tgt gac ttg gcc ccc gaa gcc aga cag gcc ata aag tcg Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Lys Ser 245 250 255	768
ctc aca gag cgg ctc tac atc ggg ggt ccc ctg act aat tca aaa ggg Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly 260 265 270	816

cag aac tgc ggt tat cgc cgg tgc cgc gcg agc ggc gtg ctg acg act Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr 275 280 285	864
agc tgc ggc aat acc ctc aca tgc tac ttg aaa gcc act gcg gcc tgt Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Thr Ala Ala Cys 290 295 300	912
cga gct gca aag ctc cag gac tgc acg atg ctc gtg aac gga gac gac Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Asn Gly Asp Asp 305 310 315 320	960
ctt gtc gtt atc tgc gaa agc gcg gga acc cag gag gat gcg gcg agc Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser 325 330 335	1008
cta cga gtc ttc acg gag gct atg act agg tac tct gcc ccc ccc ggg Leu Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly 340 345 350	1056
gac ccc ccc caa cca gaa tac gac ttg gag ctg ata acg tca tgc tcc Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser 355 360 365	1104
tcc aat gtg tcg gtc gcg cac gat gca tcc ggc aaa agg gtg tac tac Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr 370 375 380	1152
ctc acc cgt gac ccc acc acc ccc ctc gca cgg gct gcg tgg gag aca Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr 385 390 395 400	1200
gtt aga cac act cca gtc aac tcc tgg cta ggc aat atc atc atg tat Val Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr 405 410 415	1248
gcg ccc acc cta tgg gcg agg atg att ctg atg act cat ttc ttc tct Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser 420 425 430	1296
atc ctt cta gct cag gag caa ctt gaa aaa gcc ctg gat tgt cag atc Ile Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln Ile 435 440 445	1344
tac ggg gcc tgc tac tcc att gag cca ctt gac cta cct cag atc atc Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile 450 455 460	1392
gaa cga ctc cat ggt ctt agc gca ttt tca ctc cat agt tac tct cca Glu Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro 465 470 475 480	1440
ggg gag atc aat agg gtg gct tca tgc ctc agg aaa ctt ggg gta cca Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro 485 490 495	1488
ccc ttg cga gtc tgg aga cat cgg gcc aga agt gtc cgc gct aag ttg Pro Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Lys Leu 500 505 510	1536

ctg tcc cag ggg ggg agg gcc gcc act tgc ggc aaa tac ctc ttc aac	1584
Leu Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn	
515 520 525	
tgg gca gta agg acc aag ctt aaa ctc act cca atc ccg gct gcg tcc	1632
Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser	
530 535 540	
cag cta gac ttg tcc ggc tgg ttc gtt gct ggt tac aac ggg gga gac	1680
Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Asn Gly Gly Asp	
545 550 555 560	
ata tat cac agc ctg tct cgt gcc cga ccc cgt tgg ttc atg ttg tgc	1728
Ile Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Leu Cys	
565 570 575	
cta ctc cta ctt tct gta ggg gta ggc atc tac ctg ctc ccc aac cgg	1776
Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg	
580 585 590	
taa	1779

<210> 4
 <211> 592
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> séquence codant pour NS5b

<400> 4

Met Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ala	
1 5 10 15	
Ala Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu	
20 25 30	
Arg His His Ser Met Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Ser Leu	
35 40 45	
Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Asp His	
50 55 60	
Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys	
65 70 75 80	
Ala Arg Leu Leu Ser Ile Glu Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro His	
85 90 95	
Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Ser Leu	
100 105 110	
Ser Ser Arg Ala Val Asn His Ile Arg Ser Val Trp Glu Asp Leu Leu	
115 120 125	
Glu Asp Thr Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu	
130 135 140	

Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu
145 150 155 160

Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu
165 170 175

Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Pro Ser Tyr
180 185 190

Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Thr
195 200 205

Trp Lys Ser Lys Lys Cys Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys
210 215 220

Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ser Ile
225 230 235 240

Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Lys Ser
245 250 255

Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly
260 265 270

Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr
275 280 285

Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Thr Ala Ala Cys
290 295 300

Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Asn Gly Asp Asp
305 310 315 320

Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser
325 330 335

Leu Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly
340 345 350

Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser
355 360 365

Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr
370 375 380

Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr
385 390 395 400

Val Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr
405 410 415

Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser
420 425 430

Ile Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln Ile
435 440 445

Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile
450 455 460

Glu Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro
 465 470 475 480
 Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro
 485 490 495
 Pro Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Lys Leu
 500 505 510
 Leu Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn
 515 520 525
 Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser
 530 535 540
 Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Asn Gly Gly Asp
 545 550 555 560
 Ile Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Leu Cys
 565 570 575
 Leu Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg
 580 585 590

<210> 5
 <211> 1344
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> séquence codant pour NS5a

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1344)
 <223>

<400> 5
 atg tcc ggc tcg tgg cta agg gat gtt tgg gac tgg ata tgc acg gtg 48
 Met Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys Thr Val
 1 5 10 15
 ttg act gac ttc aag acc tgg ctc cag tcc aag ctc ctg ccg aaa ttg 96
 Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro Lys Leu
 20 25 30
 ccg gga gtc cct ttc ttc tca tgc caa cgc ggg tac aag gga gtc tgg 144
 Pro Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp
 35 40 45
 cgg ggg gac ggc atc atg caa acc acc tgc cca tgt gga gca caa att 192
 Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Pro Cys Gly Ala Gln Ile
 50 55 60
 acc gga cat gtc aaa aac ggt tcc atg agg atc gtt ggg cct aaa acc 240
 Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly Pro Lys Thr
 65 70 75 80

tgc	agc	aac	acg	tgg	cac	gga	acg	ttc	ccc	atc	aac	gcg	tac	acc	aca	288	
Cys	Ser	Asn	Thr	Trp	His	Gly	Thr	Phe	Pro	Ile	Asn	Ala	Tyr	Thr	Thr		
85															95		
ggc	ccc	tgc	aca	ccc	tcc	ccg	gcg	ccg	aac	tat	tcc	agg	gcg	ctg	tgg	336	
Gly	Pro	Cys	Thr	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Asn	Tyr	Ser	Arg	Ala	Leu	Trp		
100															110		
cgg	gtg	gct	gaa	gag	tac	gtg	gag	att	acg	ccg	gtg	ggg	gac	ttc	384		
Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Glu	Tyr	Val	Glu	Ile	Thr	Arg	Val	Gly	Asp	Phe		
115															125		
cac	tac	gtg	acg	ggt	atg	acc	acc	gac	aac	gta	aaa	tgc	ccg	tgc	cag	432	
His	Tyr	Val	Thr	Gly	Met	Thr	Thr	Asp	Asn	Val		Lys	Cys	Pro	Cys	Gln	
130															140		
gtc	ccg	gcc	ccc	gaa	ttc	tcc	act	gaa	ttg	gac	ggg	gtg	ccg	ttg	cac	480	
Val	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Phe	Thr	Glu	Leu	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	His		
145															150	155	160
agg	tac	gct	ccg	gcg	tgc	aga	cct	ctc	cta	ccg	gtg	gat	gtc	aca	ttc	528	
Arg	Tyr	Ala	Pro	Ala	Cys	Arg	Pro	Leu	Leu	Arg	Val	Asp	Val	Thr	Phe		
165															170	175	
cag	gtc	ggg	ctc	aac	caa	tac	ctg	gtt	ggg	tca	cag	ctc	cca	tgc	gag	576	
Gln	Val	Gly	Leu	Asn	Gln	Tyr	Leu	Val	Gly	Ser	Gln	Leu	Pro	Cys	Glu		
180															185	190	
cct	gag	ccg	gat	gtg	gca	gtg	ctc	act	tcc	atg	ctc	acc	gac	ccc	tcc	624	
Pro	Glu	Pro	Asp	Val	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Met	Ieu	Thr	Asp	Pro	Ser		
195															200	205	
cac	att	aca	gca	gag	acg	gct	aaa	cgt	agg	ccg	agg	ggg	tct	ccc	tcc	672	
His	Ile	Thr	Ala	Glu	Thr	Ala	Lys	Arg	Arg	Pro	Ala	Arg	Gly	Ser	Pro		
210															215	220	
ccc	tcc	ttg	gcc	agc	tct	tca	gct	agc	caa	ttg	tct	gct	cct	tcc	ttg	720	
Pro	Ser	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Leu	Ser	Ala	Pro	Ser	Leu			
225															230	235	240
aag	gca	aca	tgc	act	acc	cac	cat	gac	tcc	ccg	gac	gct	gac	ctc	atc	768	
Lys	Ala	Thr	Cys	Thr	Thr	His	His	Asp	Ser	Pro	Asp	Ala	Asp	Ile			
245															250	255	
gag	gcc	aac	ctc	ctg	tgg	ccg	cag	gag	atg	ggc	gga	aac	atc	acc	cgt	816	
Glu	Ala	Asn	Leu	Leu	Trp	Arg	Gln	Glu	Met	Gly	Gly	Asn	Ile	Thr	Arg		
260															265	270	
gtg	gag	tca	gag	aat	aag	gtg	gta	att	ttg	gac	tct	ttc	gac	ccg	ctt	864	
Val	Glu	Ser	Glu	Asn	Lys	Val	Val	Ile	Leu	Asp	Ser	Phe	Asp	Pro	Leu		
275															280	285	
cga	gcf	gaa	gag	gat	gag	agg	gaa	gta	tcc	gtt	gca	gca	gag	atc	ctg	912	
Arg	Ala	Glu	Glu	Asp	Glu	Arg	Glu	Val	Ser	Val	Ala	Ala	Glu	Ile	Leu		
290															295	300	
cga	aaa	tcc	aag	aag	ttc	ccc	ccc	gcg	ttg	ccc	ata	tgg	gca	cgc	ccg	960	
Arg	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Pro	Pro	Ala	Leu	Pro	Ile	Trp	Ala	Arg	Pro		
305															310	315	320

gat tac aac cct cca ctg tta gag tcc tgg aaa agt ccg gac tac gtc	1008
Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Ser Pro Asp Tyr Val	
325 330 335	
cct ccg gcg gtg cat ggg tgc cca ttg ccg cct acc acg ggc cct cca	1056
Pro Pro Ala Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Thr Thr Gly Pro Pro	
340 345 350	
ata ccg cct cca ccg aaa aag agg acg gtt gtt ctg aca gag tcc acc	1104
Ile Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr	
355 360 365	
gtg tct tct gcc ttg gcg gag ctg gct act aag act ttc ggc agc tcc	1152
Val Ser Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Gly Ser Ser	
370 375 380	
gga tcg tcg gcc gtt gac agc ggc acg gcg acc gcc cct ccc gat cag	1200
Gly Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln	
385 390 395 400	
acc tct gac gac ggt gac aaa gaa tct gac att gag tcg tac tcc tcc	1248
Thr Ser Asp Asp Gly Asp Lys Glu Ser Asp Ile Glu Ser Tyr Ser Ser	
405 410 415	
atg ccc ccc ctt gag ggg gag ccg ggg gac cct gat ctc agc gac ggg	1296
Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly	
420 425 430	
tct tgg tct acc gtg agc ggg gag gcc ggc gac gac atc gtc tgc tgc	1344
Ser Trp Ser Thr Val Ser Gly Glu Ala Gly Asp Asp Ile Val Cys Cys	
435 440 445	

<210> 6
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> séquence codant pour NS5a
<400> 6

Met Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys Thr Val	
1 5 10 15	
Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro Lys Leu	
20 25 30	
Pro Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp	
35 40 45	
Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Pro Cys Gly Ala Gln Ile	
50 55 60	
Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly Pro Lys Thr	
65 70 75 80	
Cys Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr	
85 90 95	

Gly Pro Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala Leu Trp
100 105 110

Arg Val Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Thr Arg Val Gly Asp Phe
115 120 125

His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro Cys Gln
130 135 140

Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val Arg Leu His
145 150 155 160

Arg Tyr Ala Pro Ala Cys Arg Pro Leu Leu Arg Val Asp Val Thr Phe
165 170 175

Gln Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu
180 185 190

Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser
195 200 205

His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Pro Ala Arg Gly Ser Pro
210 215 220

Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu
225 230 235 240

Lys Ala Thr Cys Thr Thr His His Asp Ser Pro Asp Ala Asp Leu Ile
245 250 255

Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg
260 265 270

Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu
275 280 285

Arg Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Ala Ala Glu Ile Leu
290 295 300

Arg Lys Ser Lys Lys Phe Pro Pro Ala Leu Pro Ile Trp Ala Arg Pro
305 310 315 320

Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Ser Pro Asp Tyr Val
325 330 335

Pro Pro Ala Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Thr Thr Gly Pro Pro
340 345 350

Ile Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr
355 360 365

Val Ser Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Gly Ser Ser
370 375 380

Gly Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln
385 390 395 400

Thr Ser Asp Asp Gly Asp Lys Glu Ser Asp Ile Glu Ser Tyr Ser Ser
405 410 415

Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly
 420 425 430

Ser Trp Ser Thr Val Ser Gly Glu Ala Gly Asp Asp Ile Val Cys Cys
 435 440 445

<210> 7
 <211> 2241
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> séquence codant pour CE1E2

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2241)
 <223>

<400> 7

atg agc aca aat cct aaa cct caa aga aaa acc aaa cgt aac acc aac 48
 Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15

cgc cgc cca cag gac gtt aag ttc ccg ggc ggt ggt cag atc gtt ggt 96
 Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30

gga gtt tac ctg ttg ccg cgc agg ggc ccc agg ttg ggt gtg cgc gcg 144
 Gly Val Tyr Ile Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45

act agg aag act tcc gag cgg tcg caa cct cgt gga agg cga caa cct 192
 Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50 55 60

atc ccc aag gct cgc cgg ccc gag ggt agg acc tgg gct cag ccc ggg 240
 Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
 65 70 75 80

tac cct tgg ccc ctc tat ggc aac gag ggt atg ggg tgg gca gga tgg 288
 Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp
 85 90 95

ctc ctg tca ccc cgt ggc tct cgg cct agt tgg ggc ccc aca gac ccc 336
 Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
 100 105 110

cgg cgt agg tcg cgt aat ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt aca tgc 384
 Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
 115 120 125

ggc ttc gcc gac ctc atg ggg tac att ccg ctt gtc ggc gcc ccc cta 432
 Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
 130 135 140

gga ggc gct gcc agg gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gag gac 480
 Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
 145 150 155 160

ggc gtg aac tat gca aca ggg aat ctg ccc ggt tgc tct ttc tct atc Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile 165 170 175	528
ttc ctc tta gct ttg ctg tct tgt ttg acc atc cca gct tcc gct tac Phe Leu Leu Ala Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr 180 185 190	576
gag gtg cgc aac gtg tcc ggg ata tac cat gtc acg aac gac tgc tcc Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser 195 200 205	624
aac tca agt att gtg tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro 210 215 220	672
ggg tgc gtg ccc tgc gtc cgg gag agt aat ttc tcc cgt tgc tgg gta Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Ser Asn Phe Ser Arg Cys Trp Val 225 230 235 240	720
gcg ctc act ccc acg ctc gcg gcc agg aac agc agc atc ccc acc acg Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ser Ser Ile Pro Thr Thr 245 250 255	768
aca ata cga cgc cac gtc gat ttg ctc gtt ggg gcg gct gct ctc tgt Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Leu Cys 260 265 270	816
tcc gct atg tac gtt ggg gat ctc tgc gga tcc gtt ttt ctc gtc tcc Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser 275 280 285	864
cag ctg ttc acc ttc tca cct cgc cgg tat gag acg gta caa gat tgc Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg Tyr Glu Thr Val Gln Asp Cys 290 295 300	912
aat tgc tca atc tat ccc ggc cac gta tca ggt cac cgc atg gct tgg Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp 305 310 315 320	960
gat atg atg atg aac tgg tca cct aca acg gcc cta gtg gta tcg cag Asp Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln 325 330 335	1008
cta ctc cgg atc cca caa gcc gtc gtg gac atg gtg gcg ggg gcc cac Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His 340 345 350	1056
tgg ggt gtc cta gcg ggc ctt gcc tac tat tcc atg gtg ggg aac tgg Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp 355 360 365	1104
gct aag gtc ttg att gtg atg cta ctc ttt gct ggc gtt gac ggg cac Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His 370 375 380	1152
acc cac gtg aca ggg gga agg gta gcc tcc agc acc cag agc ctc gtg Thr His Val Thr Gly Gly Arg Val Ala Ser Ser Thr Gln Ser Leu Val 385 390 395 400	1200

tcc tgg ctc tca caa ggg cca tct cag aaa atc caa ctc gtg aac acc		1248
Ser Trp Leu Ser Gln Gly Pro Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr		
405	410	415
aac ggc agc tgg cac atc aac agg acc gct ctg aat tgc aat gac tcc		1296
Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser		
420	425	430
ctc caa act ggg ttc att gct gcg ctg ttc tac gca cac agg ttc aac		1344
Leu Gln Thr Gly Phe Ile Ala Ala Leu Phe Tyr Ala His Arg Phe Asn		
435	440	445
gcg tcc gga tgt cca gag cgc atg gcc agc tgc cgc ccc atc gac aag		1392
Ala Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile Asp Lys		
450	455	460
ttc gct cag ggg tgg ggt ccc atc act cac gtt gtg cct aac atc tcg		1440
Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr His Val Val Pro Asn Ile Ser		
465	470	475
gac cag agg cct tat tgc tgg cac tat gca ccc caa ccg tgc ggt att		1488
Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Gln Pro Cys Gly Ile		
485	490	495
gta ccc gcg tcg cag gtg tgt ggc cca gtg tat tgc ttc acc ccg agt		1536
Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser		
500	505	510
cct gtt gtg gtg ggg acg acc gac cgt tcc gga gtc ccc acg tat agc		1584
Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ser		
515	520	525
tgg ggg gag aat gag aca gac gtg ctg cta ctc aac aac acg ccg ccg		1632
Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr Arg Pro		
530	535	540
ccg caa ggc aac tgg ttc ggc tgt aca tgg atg aat agc acc ggg ttc		1680
Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe		
545	550	555
560		
acc aag acg tgc ggg ggc ccc ccg tgt aac atc ggg ggg gtt ggc aac		1728
Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Val Gly Asn		
565	570	575
aac acc ttg att tgc ccc acg gat tgc ttc cga aag cac ccc gag gcc		1776
Asn Thr Leu Ile Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala		
580	585	590
act tac acc aaa tgc ggc tcg ggt cct tgg ttc aca cct agg tgt cta		1824
Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu		
595	600	605
gtt gac tac cca tac aga ctt tgg cac tac ccc tgc act atc aat ttt		1872
Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Phe		
610	615	620
acc atc ttc aag gtc agg atg tac gtg ggg ggc gtg gag cac agg ctc		1920
Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu		
625	630	635
		640

aac gcc gcg tgc aat tgg acc cga gga gag cgc tgt gac ctg gag gac Asn Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp 645 650 655	1968
agg gat aga tca gag ctt agc ccg ctg cta ttg tct aca acg gag tgg Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp 660 665 670	2016
cag gta ctg ccc tgt tcc ttt acc acc cta ccg gct ctg tcc act gga Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly 675 680 685	2064
ttg atc cac ctc cat cag aat atc gtg gac gtg caa tac ctg tac ggt Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly 690 695 700	2112
gta ggg tca gtg gtt gtc tcc gtc gta atc aaa tgg gag tat gtt ctg Val Gly Ser Val Val Val Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu 705 710 715 720	2160
ctg ctc ttc ctc ctg gcg gac gcg cgc gtc tgt gcc tgc ttg tgg Leu Leu Phe Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp 725 730 735	2208
atg atg ctg ctg ata gcc cag gct gag gcc tga Met Met Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala 740 745	2241

<210> 8
<211> 746
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> séquence codant pour CE1E2

<400> 8

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn 1 5 10 15
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly 20 25 30
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala 35 40 45
Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro 50 55 60
Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly 65 70 75 80
Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp 85 90 95
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro 100 105 110

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
115 120 125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
130 135 140

Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
145 150 155 160

Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
165 170 175

Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr
180 185 190

Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser
195 200 205

Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro
210 215 220

Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Ser Asn Phe Ser Arg Cys Trp Val
225 230 235 240

Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ser Ser Ile Pro Thr Thr
245 250 255

Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Leu Cys
260 265 270

Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser
275 280 285

Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg Tyr Glu Thr Val Gln Asp Cys
290 295 300

Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp
305 310 315 320

Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln
325 330 335

Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His
340 345 350

Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp
355 360 365

Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His
370 375 380

Thr His Val Thr Gly Gly Arg Val Ala Ser Ser Thr Gln Ser Leu Val
385 390 395 400

Ser Trp Leu Ser Gln Gly Pro Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr
405 410 415

Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
420 425 430

Leu Gln Thr Gly Phe Ile Ala Ala Leu Phe Tyr Ala His Arg Phe Asn
435 440 445

Ala Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile Asp Lys
450 455 460

Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr His Val Val Pro Asn Ile Ser
465 470 475 480

Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Gln Pro Cys Gly Ile
485 490 495

Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
500 505 510

Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ser
515 520 525

Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr Arg Pro
530 535 540

Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
545 550 555 560

Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Val Gly Asn
565 570 575

Asn Thr Leu Ile Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
580 585 590

Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu
595 600 605

Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Phe
610 615 620

Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
625 630 635 640

Asn Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
645 650 655

Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp
660 665 670

Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
675 680 685

Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
690 695 700

Val Gly Ser Val Val Val Ser Val Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu
705 710 715 720

Leu Leu Phe Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp
725 730 735

Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala
740 745

<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV166

<400> 9
gggggggcta tggcgctat cacggccta

29

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV171

<400> 10
ggggggacgc gtttagcatg gcgtggagca gt

32

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV232

<400> 11
ggggggagat ctccagcaagg cagaagtatg

30

<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorceoIV233

<400> 12
gggggggtcg accgaaaatg gatatacaag ctc

33

<210> 13
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV212

<400> 13
ggggggtcta gaatgtcaat gtcctacaca tggac

35

<210> 14
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV218

<400> 14
gggggtctta gattaccgggt tggggagcag gt

32

<210> 15
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV225

<400> 15
ggggggctgc agatggcgcc tatcacggcc ta

32

<210> 16
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV226

<400> 16
gggggtctta gattagcatg gcgtggagca gt

32

<210> 17
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV227

<400> 17
gggggggtcg acatgtcaat gtcctacaca tggac

35

<210> 18
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV228

<400> 18
ggggggggcat gcttaccgggt tggggagcag gt

32

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV229

<400> 19
ggggggtcta gaccggtagt tcgcataatac ata

33

<210> 20
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV172

<400> 20
ggggggggta ccatgtccgg ctcgtggcta agg

33

<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV173

<400> 21
ggggggtcta gattagcagc agacgatgtc gtc

33

<210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV62

<400> 22
gggggggcta gcatgagcac aaatcctaaa cct

33

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce oIV68

<400> 23
ggggggtcta gatcaggcct cagcctggc tat

33

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> épitope GLL

<400> 24

Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> épitope ALY

<400> 25

Ala Leu Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> épitope KLQ

<400> 26

Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> épitope DLM

<400> 27

Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val
1 5